THESES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

le grade de Docteur-Ès-Sciences

par

Hugues SCHWEITZ

Ingénieur Chimiste ENSCS
Attaché de Recherches au CNRS

Première Thèse

ÉTUDE DE L'ACTION DE QUELQUES PEROXYDES SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DU D NA ET DE SES CONSTITUANTS

Deuxième Thèse

Propositions données par la Faculté

Soutenues le Juin 1967 devant la Commission d'examen

MM. Ch. SADRON Président
J.P. EBEL
M. DAUNE Examinateurs
Mme D. LUZZATI

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552704_0011

THESES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

le grade de Docteur-Ès-Sciences

par

Hugues SCHWEITZ

Ingénieur Chimiste ENSCS
Attaché de Recherches au CNRS

Première Thèse

ÉTUDE DE L'ACTION DE QUELQUES PEROXYDES SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DU DINA ET DE SES CONSTITUANTS

Deuxième Thèse

Propositions données par la Faculté

Soutenues le Juin 1967 devant la Commission d'examen

MM.	Ch. SADRON	Président
	J.P. EBEL	
	M. DAUNE	Examinateurs
Mme	D. LUZZATI	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE STRASBOURG
FACULTE DES SCIENCES

Edition d'Avril 1967

Doyen : Professeur J.H. VIVIEN
Doyens Honoraires : A. DANJON, A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE, G. MILLOT.
Professeurs Honoraires : P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H. CARTAN, G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, A. DANJON, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, H. GAULT, Mle S. GILLET, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, Ch. SADRON, E. TERROINE, R. THIRY, H. VILLAT, H. WEISS, Et. WOLFF, J. YVON.
Maître de Conférences Honoraire : R. WEIL.

Professeurs :

H.J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
A. ROUSSEL	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A. MAILLARD	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mle M. PEREY	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mle A. GAGNIEU	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	T.T.P.	Chimie biologique
J. BRENET	T.	Electrochimie
G. OURISSON	T.T.P.	Chimie
~~Cl. LEVI~~	~~T.T.P.~~	~~Biologie générale~~
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.	Physique générale
J. FRENKEL	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG	T.	Physique
J.P. LONCHAMP	T.T.P.	Physique
A. DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER	T.T.P.	Physique
A. KOCHE	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
A. SIGOT	P.S.C.	Zoologie
J. COGNE	T.T.P.	Géologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	T.T.P.	Physique
P. MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale

T.S.V.P.

J.P. EBEL	T.	Chimie biologique
J.PAROD	T.T.P.	Chimie
R. WEY	T.T.P.	Chimie
Mme D. MAGNAC	T.T.P.	Physique
M. DAUNE	P.S.C.	Physique
J.P. ADLOFF	T.T.P.	Chimie nucléaire
D. BERNARD	T.T.P.	Méthodes mathématiques de la physique
M. ZISMAN	T.T.P.	Mathématiques
E. DANIEL	T.	Physique expérimentale
P. CHEVALLIER	P.S.C.	Physique
J. GREMILLARD	T.T.P.	Mathématiques
P. CARTIER	T.	Mathématiques M.P.C.
G. REEB	T.	Topologie
F. NORGUET	T.	Analyse supérieure
R. CHAUVIN	T.	Psychophysiologie
J. WUCHER	P.S.C.	Physique
Mme M. BRINI	P.S.C.	Chimie
G. PERNY	P.S.C.	Physique
R. BARO	P.S.C.	Physique
H. DURANTON	P.S.C.	Botanique
R. WEISS	T.T.P.	Chimie
P. FEDERLIN	T.T.P.	Chimie
J. LERAY	P.S.C.	Physique
J.P. SCHWING	P.S.C.	Chimie
M. SIESKIND	P.S.C.	Physique
G. MONSONEGO	P.S.C.	Physique mathématique
P. GABRIEL	T.T.P.	Mathématiques
C. WIPPLER	T.	Physicochimie des Hauts Polymères Industri
P.A. MEYER	T.T.P.	Mathématiques
G. WEILL	P.S.C.	Physique
J.M. BLOCH	T.	Chimie
A. CLAUSS	P.S.C.	Chimie
R. OMNES	P.S.C.	Physique théorique
E. FOLLENIUS	P.S.C.	Zoologie
J. LUCAS	P.S.C.	Géologie

Professeurs associés :

S.R. DE GROOT	Physique nucléaire
K. VESELY	Physicochimie macromoléculaire

Maîtres de Conférences :

H. DANAN	Physique
Mme WINTER Chr.	Physique
J.P. EBERHART	Minéralogie
Mme D. CAGNIANT	Chimie
X. FERNIQUE	Mathématiques
J. STREITH	Chimie
J. WEIL	Chimie biologique
F. GAUTIER	Physique propédeutique
G. SUTTER	Physique électronique
D. FOATA	Mathématiques
J.L. VERDIER	Mathématiques
J.M. LEHN	Chimie
Cl. ROBERT	Physique

Maîtres de Conférences associés :

V. AVANISSIAN	Mathématiques
R.A. MASSY WESTROPP	Chimie organique

Secrétaire : G. SAINT-PE.

A mes Parents
A ma Femme

A Monsieur Charles SADRON
A Madame Denise LUZZATI

Monsieur le Professeur SADRON, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance. L'intérêt constant que vous avez manifesté pour mon travail m'a beaucoup aidé à surmonter les difficultés rencontrées, et votre respect de la liberté d'autrui, que j'ai toujours éprouvé en votre présence m'a été une expérience humaine très enrichissante.

Madame LUZZATI, vous m'avez accueilli dans votre groupe de Recherches où j'ai bénéficié d'un climat d'excellente camaraderie. Le sujet de recherches que vous m'avez proposé a captivé mon intérêt et c'est grâce à votre expérience que j'ai osé aborder l'étude d'une macromolécule biologique. Enfin, votre aide au cours de la rédaction de cette thèse m'a été particulièrement utile. Je vous en exprime ma profonde gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur BENOIT, dont les conseils m'ont aidé à résoudre certains problèmes théoriques soulevés par l'interprétation de mes résultats.

Je suis reconnaissant à Monsieur le Professeur EBEL de s'être intéressé à mon travail et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie Monsieur le Professeur DAUNE pour le temps qu'il a bien voulu consacrer à examiner les problèmes théoriques et pratiques soulevés par mes expériences, ainsi que Madame CHEVALLIER et Monsieur BERNARDI qui m'ont fait bénéficier de leur expérience avec beaucoup de complaisance.

Enfin je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur POUYET qui m'a fourni les échantillons de DNA, Madame POUYET qui a effectué les mesures de sédimentation, Monsieur RUEFF et Madame DUBOIS qui ont effectué la synthèse de l'acide peracétique et de la 6-hydroxylaminopurine. Je remercie enfin toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à mener à bien mon travail, et en particulier Madame NOPPER et Monsieur SCHIERER pour leur aide précieuse dans l'impression de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES

I) MATERIEL

1) Peroxydes 5
2) Bases, nucléosides, nucléotides
3) DNA

II) METHODES BIOCHIMIQUES

1) Dosage des peroxydes et de l'eau oxygénée 7
2) Mesure des concentrations des solutions de bases, nucléosides, nucléotides et DNA 9
3) Détermination de la composition en basès du DNA

A. Par hydrolyse formique et chromatographie sur papier 10
B. Par hydrolyse enzymatique et chromatographie sur colonne 15

4) Séparation et analyse par chromatographie sur gel de Séphadex de la fraction dialysable libérée lors de l'action de l'eau oxygénée sur le DNA 16
5) Chromatographie sur papier des bases, nucléosides et nucléotides 17

III) METHODES PHYSIQUES

1) Diffusion de la lumière 21
2) Courbes de transition du DNA 24
3) Sédimentation 25
4) Diffusion centrale des rayons X 28

CHAPITRE II - ACTION DE L'ACIDE PERSUCCINIQUE SUR LE DNA ET SES CONSTITUANTS

I) ACTION SUR LES BASES ET LES DEOXYRIBONUCLEOTIDES - DECOMPOSITION DU PEROXYDE

Introduction 30

1) Décomposition de l'acide persuccinique

A. En absence de bases ou nucléotides 32

B. En présence de bases ou nucléotides 36

2) Action sur les bases et les déoxyribonucléotides

A. Action sur les hétérocycles des bases libres 42

B. Action sur les hétérocycles des déoxyribonucléotides libres 50

C. Evaluation de la participation de l'eau oxygénée formée à cette action 50

D. Action de l'acide persuccinique sur les liaisons déoxyribose-phosphate et déoxyribose base des nucléotides 52

Discussion 58

II) ACTION SUR LE DNA

1) Modifications de la composition chimique du DNA

A. Etude par hydrolyse formique et chromatographie sur papier 63

Discussion 68

B. Etude par hydrolyse enzymatique et chromatographie sur colonne 72

2) Modifications des propriétés physicochimiques du DNA

A. Etude par diffusion de la lumière 73

B. Etude par diffusion centrale des rayons X 75

C. Etude des courbes de transition 75

D. Action de l'acide persuccinique sur la dénaturabilité du DNA par la chaleur 78

Discussion 80

CHAPITRE III - ACTION DE L'EAU OXYGENEE SUR LE DNA ET SES CONSTITUANTS

Introduction 83

I) ETUDE DE LA DECOMPOSITION DE L'EAU OXYGENEE

Revue Bibliographique 84

Etude expérimentale 87

Discussion 92

1) Influence des agents chélatants sur la vitesse de décomposition de l'eau oxygénée 93

2) Influence des agents chélatants sur l'activité oxydante de l'eau oxygénée 94

II) ACTION DE L'EAU OXYGENEE SUR LES BASES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES ET LEURS DEOXYRIBONUCLEOTIDES

1) Action sur les hétérocycles 97

2) Action sur les liaisons déoxyribose-phosphate et déoxyribose-base 104

Discussion 108

III) ACTION DE L'EAU OXYGENEE SUR LE DNA

Introduction 113

1) Modification de la composition chimique du DNA

a) en absence d'ions métalliques 113

b) en présence d'ions métalliques 114

Discussion 121

2) Modification des propriétés physico-chimiques du DNA

A. Théorie de la dégradation d'un polymère en double chaîne

- Revue bibliographique 126

- Développement du calcul 127

- Applications pratiques 137

B. Résultats expérimentaux
a) Action de l'eau oxygénée sur le DNA en absence d'ions métalliques ajoutés
α) Influence de l'intensité d'éclairement 147
β) Etude de la variation de quelques paramètres physico-chimiques 156
Discussion 158
b) Action de l'eau oxygénée sur le DNA en présence d'ions métalliques de transition 162
— Revue bibliographique sur les interactions DNA-ions cuivre et fer 163
— Résultats expérimentaux
α) Action à l'obscurité 166
β) Action à la lumière 176
c) Action des ions métalliques de transition sur la configuration du DNA 176
Discussion 180

CHAPITRE IV - ACTION D'AUTRES PEROXYDES SUR LE DNA

Introduction 186
I) ACTION DE L'ACIDE PERACETIQUE SUR LE DNA
1) Décomposition de l'acide peracétique 187
2) Action de l'acide peracétique sur le DNA 187
II) ACTION DES HYDROPEROXYDES DE CUMENE ET DE BUTYLE TERTIAIRE SUR LE DNA
1) Décomposition des hydroperoxydes 191
2) Action de l'hydroperoxyde de butyle tertiaire sur la cytosine 192
3) Action des hydroperoxydes sur le DNA 192
Discussion 193
CONCLUSION ET PERSPECTIVES 194
BIBLIOGRAPHIE 200

INTRODUCTION

A l'origine, ce travail avait pour but l'étude des modifications physicochimiques produites sur le DNA par les peroxydes, substances "radiomimétiques", dont on pouvait espérer que leur effet serait plus défini que celui des radiations ionisantes elles-mêmes (LATARJET 1956). On savait déjà que les peroxydes ont un effet mutagène ; en particulier F.H. DICKEY et coll. (1949), WAGNER et coll. (1950) et K.A. JENSEN (1951) avaient obtenu des mutations chez Neurospora par l'action de l'eau oxygénée et des peroxydes ; L.S. ALTENBURG (1954) en a observé chez la drosophile par action de l'hydroperoxyde de butyle tertiaire et F.H. SOBELS (1954) par action du peroxyde de dihydroxyméthyle ; D. LUZZATI et M.R. CHEVALLIER (1957 et 1960) ont observé un effet mutagène spécifique chez E.Coli B par action du peroxyde de disuccinoyle. VAN ARKEL (1958) a obtenu des mutations chez Aspergillus Nidulans par action de divers peroxydes. On savait par ailleurs que les peroxydes sont susceptibles d'inactiver in vitro le pouvoir transformant de pneumocoque (LATARJET et coll. 1958). En 1961 D. LUZZATI, H. SCHWEITZ, M.L. BACH et M.R. CHEVALLIER ont montré que le peroxyde de disuccinoyle est susceptible d'inactiver in vitro trois marqueurs d'un DNA de H. Influenzae et en 1964, M.R. CHEVALLIER a montré que les mutations spécifiques induites chez E. Coli 15 T⁻ par le peroxyde doivent probablement être attribuées à son effet direct, in vivo, sur le DNA bactérien.

Sachant que des peroxydes introduits dans les cellules vivantes, ou produits par irradiation de ces cellules, provoquent des mutations, et ceci vraisemblablement par une action directe sur le DNA, il était intéressant d'entreprendre une étude systématique de l'action de quelques peroxydes sur le DNA in vitro. Nous avons choisi des peroxydes

mutagènes, et parmi ceux-ci, nous avons plus spécialement étudié l'action du peroxyde de disuccinoyle et de l'eau oxygénée. Ces deux peroxydes ont les avantages d'être très différents, (tant par leur structure que par leur mode de décomposition, d'action chimique et biologique), et de pouvoir dériver de constituants normaux de la cellule (acide succinique et eau).

Initialement, nous nous sommes surtout intéressés à l'action du peroxyde de disuccinoyle à cause de son grand effet inactivant sur le DNA transformant et de son action mutagène spécifique sur E. Coli, Nous avons essayé de relier cette action mutagène spécifique à une spécificité d'action du peroxyde sur le DNA in vitro au niveau des bases.

En ce qui concerne l'eau oxygénée, son action biologique n'est pas aussi marquée que celle du peroxyde de disuccinoyle, du moins dans les conditions où elle a été utilisée jusqu'à présent (LATARJET et coll. 1958). Nous avons quand même entrepris l'étude de son action sur le DNA, d'une part parce qu'il s'en forme lors de l'action du peroxyde de disuccinoyle sur les solutions aqueuses, et d'autre part parce que BUTLER et CONWAY (1953) ont montré qu'en présence de lumière ultra-violette elle se décompose en espèces radicalaires dont les effets sur les solutions de DNA et de ses constituants sont tout-à-fait comparables à ceux des radiations ionisantes. Par la suite, c'est surtout en présence d'ions métalliques de transition comme catalyseurs, que l'action de l'eau oxygénée s'est avérée être intéressante. On peut en effet s'attendre dans ces conditions à une spécificité plus grande de cette action, due à la fixation privilégiée des ions métalliques en certains sites du DNA (ROPARS 1966, EICHHORN et coll. 1962, 1965 et 1966). L'obtention d'une dégradation de la molécule de DNA en certains points privilégiés et connus, présente évidemment un grand intérêt,

tant d'un point de vue analytique (analyse des séquences et étude du pouvoir transformant) qu'à cause de sa signification biologique éventuelle (H_2O_2 et les ions de métaux de transition sont des constituants normaux des cellules).

Pour chaque peroxyde utilisé (succinique, acétique, de cumène, de butyle tertiaire et H_2O_2, nous avons commencé par étudier ses modes de décomposition dans des conditions se rapprochant des conditions physiologiques, l'influence des catalyseurs et inhibiteurs, et en particulier du substrat (DNA et ses dérivés) sur cette décomposition. Nous avons ensuite étudié son action sur les bases, les nucléotides et enfin sur le DNA lui-même. En ce qui concerne le DNA, nous avons fait une très large place à l'étude des modifications des propriétés physiques (masse moléculaire, configuration, structure secondaire), ce qui nous a amené à élaborer une théorie statistique de dégradation d'une molécule en double chaîne permettant de rendre compte des résultats obtenus sur le DNA, tant avec l'eau oxygénée qu'avec d'autres agents dégradants (DNAse, ultra-sons).

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES

I - Matériel

1) Peroxydes utilisés

Peroxyde de Disuccinoyle : Le premier échantillon de ce peroxyde nous a été fourni par M. EKERT du Laboratoire de la Fondation Curie. Par la suite, nous en avons effectué la synthèse nous-même, en faisant agir l'eau oxygénée concentrée sur l'anhydride succinique d'après la méthode de BLUM (1959) inspirée de celle de CLOVER et HOUGHTON (1904). Nous avons ainsi obtenu un peroxyde à 96 - 98 % de pureté contenant moins de 0,5 % d'eau oxygénée. La solubilité dans l'eau de ce peroxyde est de quelques grammes par litre.

Acide Peracétique : La synthèse en a été effectuée au Service de Chimie du Centre de Recherches sur les Macromolécules par M. RUEFF selon la méthode décrite dans "Organic Reactions". Ce peracide a été obtenu à la concentration de 8 % dans l'acide acétique et contenant environ 1 % d'eau.oxygénée.

Eau Oxygénée (H_2O_2) : Nous avons utilisé l'eau oxygénée "Merck" à 30 %.

Hydroperoxydes de Cumène et de tert-Butyle : Des échantillons de ces hydroperoxydes ont été mis gracieusement à notre disposition par "l'Elektrochemische Werke" de Münich. L'hydroperoxyde de Cumène était dissout à la concentration de 71 % dans des alcools et cétones, sa solubilité dans l'eau est faible : de l'ordre de 0,5 à 1 g:Litre. L'hydroperoxyde de tert-Butyle

était à la concentration de 77 % dans l'hydroperoxyde de ditert-Butyle. Sa solubilité dans l'eau est un peu plus grande que celle de l'hydroperoxyde de Cumène.

2) Bases, nucléosides, nucléotides

Ces composés proviennent pour la plupart de la "California Corporation for Biochemical Research". Les formamidopyrimidines et la 8-hydroxyadénine ont été mises aimablement à notre disposition par le Dr. G.B. BROWN du "Sloan Kettering Institute for Cancer Research". La 6-hydroxylaminopurine a été synthétisée par Mme DUBOIS dans le laboratoire de M. RUEFF.

3) DNA

Les échantillons de DNA de thymus de Veau utilisés dans ce travail ont été préparés par MM. POUYET et ANCEL selon une méthode dérivant de celle de SIGNER et SCHWANDER (1949 et 1950) pour les échantillons PFI 1, PFI 2 et V 202, et selon une méthode dérivant de celle de KAY, SIMMONS et DOUNCE (1952) pour les échantillons V 236 et V 268.

Tableau I

Caractéristiques des échantillons de DNA utilisés (J. POUYET, communication personnelle). Ces valeurs ont été déterminées en NaCl M.

	10^{-6} M	M/L$_o$ (par Å)	(Å)	Z		S_{20}	N/P
PFI 1	7		2870	4,7	6250		1,5
PFI 2	6,5		2140	3,8	6860		1,6
V 202	4,7		2350	3,8	6170		1,7
V 236	4,1	280	2350	3,7	6560		1,6
V 268	4,8	300	2460	3,7	6690	20	

II - Méthodes biochimiques

1) Dosage des peroxydes et de l'eau oxygénée

Eau oxygénée

a) par iodométrie : d'après la méthode de GROH (1957). On ajoute 5 ml d'acide sulfurique 4 N à 10 ml d'eau oxygénée environ N/20, puis, après avoir fait barboter du gaz carbonique, on ajoute 1 g d'iodure de potassium et quelques gouttes d'une solution de Molybdate de sodium à 3 % comme catalyseur. On laisse reposer le mélange 5 minutes à l'obscurité, on complète son volume à 50 ml avec de l'eau fraîchement distillée et on titre avec une solution d'hyposulfite de sodium N/20 avec empois d'amidon comme indicateur, ajouté seulement en fin de titrage.

b) par la méthode de BLUM (1959) au sulfate cérique : A 10 ml d'eau oxygénée environ N/20, on ajoute 50 ml d'eau, 10 ml d'acide sulfurique 4 N et 3 gouttes de ferroïne. On titre par une solution N/20 de sulfate cérique en milieu acide sulfurique 4 N. Le virage est indiqué par le changement de coloration de la ferroïne qui passe du rouge au bleu.

Cette deuxième méthode permet le dosage de l'eau oxygénée en présence de peracides, ces derniers étant sans action sur les sels céreux ou cériques.

Mélanges de peroxydes de disuccinoyle, d'acide peracétique et d'eau oxygénée

En milieu aqueux, le peroxyde de disuccinoyle s'hydrolyse en acide succinique et acide persuccinique, ce dernier s'hydrolyse à son tour en acide succinique et H_2O_2, il est donc nécessaire de pouvoir doser simultanément ces trois composés dans un mélange. Sur des quantités aliquotes nous avons

dosé :

- Le pouvoir oxydant total par iodométrie.

- Le peroxyde de disuccinoyle plus l'eau oxygénée par iodométrie après destruction du peracide par le sulfure de diphényle.

- L'eau oxygénée seule, directement par le sulfate cérique.

Nous avons synthétisé le sulfure de diphényle d'après la méthode de G. DOUGHERTY et P.D. HOMMOND (1935). La méthode de dosage avec le sulfure de diphényle est dérivée de celle utilisée par HORNER et JURGENS (1958) en milieu organique, nous l'avons modifiée par le dosage en milieu aqueux en utilisant de l'alcool qui solubilise le sulfure de diphényle. Pour le dosage en milieu anhydre nous avons utilisé l'acétone anhydre, solvant à la fois du sulfure de diphényle et du peroxyde de disuccinoyle et n'hydrolysant pas ce dernier.

a) Dosage en milieu anhydre : on dissout 20 à 50 mg de peroxyde de disuccinoyle anhydre dans 10 ml d'acétone anhydre. On ajoute 2 à 5 ml d'une solution de sulfure de diphényle à 2 % dans l'acétone anhydre. On attend 10 minutes. Puis on procède comme pour le dosage d'un mélange de peracides et d'eau oxygénée en laissant 15 minutes à l'obscurité au contact de l'iodure de potassium.

b) Dosage en milieu aqueux : A 10 ml d'une solution aqueuse de peroxyde, on ajoute 10 ml d'alcool éthylique, puis une solution alcoolique à 2 % de sulfure de diphényle (1 ml pour 10 mg de peroxyde, environ). On attend 10 minutes et on procède comme ci-dessus.

Dans un mélange ne contenant que des peracides et de l'eau oxygénée, on peut doser H_2O_2 soit directement par le sulfate cérique, soit indirectement par iodométrie après destruction du peracide par le sulfure de diphényle, l'écart

entre ces deux déterminations est inférieur à 1 %.

Mélange d'acide peracétique et d'eau oxygénée

Le dosage se fait comme pour le mélange d'acide persuccinique et d'eau oxygénée. Le pouvoir oxydant total étant dosé par iodométrie et l'eau oxygénée seule par le sulfate cérique.

Hydroperoxyde de cumène et hydroperoxyde de tert-butyle

Ces deux peroxydes sont dosés à chaud par la méthode de WAGNER, SMITH et PETERS décrite par TOBOLSKY et MESROBIAN (1954). Le dispositif expérimental a été amélioré par BLUM (1959) : c'est celui que nous avons utilisé.

2) Mesure des concentrations des solutions de DNA, des bases, nucléosides et nucléotides

Bases, nucléosides et nucléotides : Leurs concentrations sont déterminées à partir de la densité optique à la longueur d'onde du maximum d'absorption dans l'U.V. et des valeurs des absorptions molaires correspondantes au pH de mesure ("The Nucleic Acids" 1955, Vol. II, p. 502).

DNA : Pour tous les échantillons utilisés, les valeurs des absorptions molaires ont été déterminées par dosage du phosphore (méthode de BRIGGS ou MARTIN-DOTY) et par absorption ultra-violette à 260 mμ. A partir de ces valeurs, et sachant que le DNA de thymus de Veau contient 9,89 % de phosphore, les concentrations des solutions ont été déterminées avant dénaturation ou dégradation par simple mesure de leur densité optique à 260 mμ. Nous les exprimerons soit en mg/ml, soit en molarité, rapportée au phosphore.

La précision est de l'ordre de 5 % sur la valeur absolue de la concentration et de l'ordre de 0,5 % sur les valeurs relatives des concentrations des solutions faites à partir d'une même solution mère.

3) Détermination de la composition en bases du DNA

A - Par hydrolyse formique et chromatographie sur papier

Nous avons employé la méthode de WYATT (1951) en y apportant quelques améliorations, en particulier nous avons déterminé la composition optima du solvant de chromatographie (Isopropanol - HCl - Eau) en fonction de la température. Après avoir fait un grand nombre de chromatogrammes, nous avons en effet trouvé que l'adénine est respectivement mal séparée de la guanine ou de la cytosine suivant que la concentration en isopropanol est trop forte ou trop faible, et que la concentration, (en volume ajouté) d'isopropanol permettant d'obtenir la meilleure séparation des bases, est donnée par la relation :

$$\% \text{ Isopropanol} = 75 - 0{,}63\ t°C \qquad 16° < t < 25°$$

La concentration en acide chlorhydrique doit toujours être 2 N dans le mélange final.

La méthode employée a été la suivante : le solutions de DNA traitées par un peroxyde sont d'abord dialysées plusieurs fois contre de l'eau distillée pour éliminer les sels et les bases du DNA libérés dans la solution, elles sont ensuite deshydratées par lyophilisation (la précipitation par l'alcool aurait entraîné la perte d'oligonucléotides).

Hydrolyse formique : 5 mg de DNA sec sont mis dans un tube en pyrex à parois épaisses ($\varnothing$ = 13 mm, ℓ = 20 cm). On ajoute 2 à 3 ml d'acide formique à 98 - 99 % (Merck) et on élimine l'air pouvant oxyder le DNA en faisant passer un courant de gaz

carbonique avant de sceller le tube, qui sera chauffé dans une étuve pendant une heure à 175°. (les 30 minutes préconisées par WYATT étaient apparues insuffisantes pour obtenir une hydrolyse complète du DNA). On gèle ensuite le liquide (qui doit avoir une couleur brunâtre si l'hydrolyse s'est faite convenablement) avant d'éliminer les gaz sous pression en présentant le haut du tube à une flamme fine permettant la fusion locale du verre. L'acide formique, maintenu à environ 50°, est évaporé par un courant de gaz carbonique ou d'azote. Le résidu charbonneux, résultant de la carbonisation du déoxyribose, et contenant les bases, est repris par 0,3 ml d'acide chlorhydrique normal, chauffé à 60° pour faciliter la dissolution des bases et centrifugé à 8.000 tours par minute pendant 5 minutes. Le liquide surnageant est recueilli à l'aide d'une pipette Pasteur très effilée. Le résidu est repris de la même façon par 0,2 ml d'acide chlorhydrique normal. Les surnageants sont rassemblés et on détermine la densité optique de cet hydrolysat à 260 mμ par dilution directe de 10 λ dans la cuve de mesure de 3 ml. Le dosage du phosphore a toujours été fait en triple avec 10 λ d'hydrolysat correspondant à environ 10 γ de phosphore ou 0,1 mg de DNA (méthode de MARTIN-DOTY 1949), ou en double avec 0,1 en 0,2 ml d'hydrolysat correspondant à environ 0,1 ou 0,2 mg de phosphore (méthode de BRIGGS 1922). Sur certains échantillons nous avons aussi dosé l'azote par la méthode de Kjeldahl. D'après la valeur trouvée par sa densité optique à 260 mμ, on met sur le chromatogramme entre 20 et 40 λ d'hydrolysat (volume qui, dilué dans 1 ml, aurait une densité optique d'neviron 8, ce qui correspond à 0,3 mg de DNA). On voit donc que la plus petite quantité de DNA permettant un dosage des bases présentes par rapport au phosphore est d'environ 0,6 mg). La meilleure séparation chromatographique a été obtenue en plaçant l'hydrolysat sous forme d'une tache allongée (1 à 1,5 cm) parallèlement au front du solvant. Le papier

utilisé a toujours été le Whatman n° 1. Le solvant utilisé est le mélange Isopropanol, acide chlorhydrique, eau, aux concentrations indiquées ci-dessus. Le temps de migration est d'environ 30 heures. Après séchage pendant une nuit, les taches des bases du DNA sont détectées à l'aide d'une lampe U.V. (MARKHAM et SMITH 1949).

Pour les DNA dont les bases ont été dégradées, une chromatographie bidimensionnelle avec un deuxième solvant est nécessaire pour séparer les bases nouvelles de celles qui sont normalement présentes dans le DNA.

Au solvant utilisé classiquement par la séparation des bases (butanol/ammoniaque), nous avons préféré l'eau ammoniacale à pH 10 (CHARGAFF, 1955, Vol. I).

Eau distillée : 250 ml
Ammoniaque (Conc) : 4 ml

Ce solvant, contrairement au précédent, permet la séparation entre guanine et hypoxanthine. Les taches, décelées aux U.V., sont découpées en même temps qu'un blanc situé à la même hauteur, puis éluées pendant une dizaine d'heures dans 3 ou 5 ml d'acide chlorhydrique N/10 pour les pyrimidines et N pour les purines, (à cause de la faible solubilité de ces dernières). Les densités optiques des éluats sont déterminées au spectrophotomètre Zeiss, d'une part aux maxima d'absorption en vue de la détermination de la concentration, d'autre part à 250, 260, 280 et 290 mμ pour apprécier la pureté du produit d'après les rapports des absorptions correspondantes. Les valeurs trouvées pour les concentrations, rapportées au phosphore dosé, permettent de calculer la fraction molaire de chaque base se trouvant dans l'hydrolysat pour un atome gramme de phosphore.

Nous avons ainsi analysé 16 échantillons témoins (4 de PFI 1, 9 de PFI 2, 2 de V 202 et 1 de V 268) dont 6 avaient été préalablement incubés pendant 24 heures à 37° en présence de succinate de sodium à pH 7 et de quelques gouttes de chloroforme comme antiseptique, puis dialysés contre de l'eau distillée et lyophilisés. Pour ces derniers échantillons, la récupération moyenne, en mole de base par atome gramme de phosphore, est, non pas plus faible comme on pouvait s'y attendre, mais de 5 % plus grande (97 % ± 1 & 2 %) que pour les échantillons non incubés, ni dialysés (92 % ± 1 %) (Tableau II). L'écart entre ces moyennes est significatif, compte tenu des erreurs à craindre. L'explication la plus vraisemblable est que les échantillons de DNA utilisés contenaient quelques traces de phosphoprotéines ou de phospholipides (CHARGAFF "The Nucleic Acids", 1955, Vol. II p. 5 et 121) lesquelles sont libérées par dialyse après incubation à 37° dans le tampon succinate.

Dans la suite, nous ne tiendrons cependant pas compte de cet écart qui n'affecte pas le rapport entre les bases et qui est du même ordre de grandeur que l'écart type entre ces mesures qui est de 4 % (Tableau II).

Nous admettrons donc que la méthode ainsi employée nous permettra de déterminer la composition chimique d'un DNA avec une erreur de ± 5 %. La valeur moyenne de la fraction de chaque base récupérée est très satisfaisante puisqu'on obtient les mêmes valeurs pour l'adénine et la thymine (0,277) et pour la guanine et la cytosine (0,223), le rapport A + T / G + C étant 1,25.

Tableau II

Résumé des résultats des analyses des DNA de thymus "Témoins"

DNA	Nombre d'échantillons	Guanine*	Adénine*	Cytosine*	Thymine*	A + T / G + C	Récupération Base/Phosphore
(1)	10	0,224	0,276	0,223	0,277	1,24	0,92
		**± 0,001	± 0,001	± 0,002	± 0,002		± 0,011
(2)	6	0,221	0,279	0,222	0,279	1,26	0,97
		**± 0,001	± 0,002	± 0,002	± 0,002		± 0,015
(3)	16	0,223	0,277	0,223	0,277	1,25	0,94
		**					± 0,010

(1) DNA Témoin : DNA sec, directement dissout dans l'acide formique pour hydrolyse.

(2) Idem après une incubation dans un Tampon Succinate de Sodium 0,1 M à pH 7 pendant 30 heures à 37°, suivie de dialyse et lyophilisation avant hydrolyse formique.

(3) Ensemble des échantillons analysés

** Erreur à craindre : $\mathcal{E} = \frac{1}{\sqrt{n-1}} \sqrt{\frac{\Sigma \Delta^2}{n}}$, n étant le nombre de mesures et Δ l'erreur individuelle, c'est-à-dire la valeur absolue de la différence entre chaque mesure et la valeur moyenne des mesures.

* Valeur exprimée en fractions de la somme des bases récupérées.

B - Détermination de la composition en nucléotides du DNA par chromatographie sur colonne

Cette méthode a été employée dans le but de mettre en évidence la formation éventuelle par peroxydation du DNA de produits qui, étant trop labiles, pourraient être détruits au cours de l'hydrolyse formique du DNA.

Le DNA est hydrolysé en déoxyribonucléosides-5'-phosphate par digestions successives par la DNAse pancréatique (48 heures) et la phosphodiestérase suivant la méthode décrite par LEHMAN, BESSMAN, SIMMS et KORNBERG (1958), en laissant agir la phosphodiestérase pendant 12 heures au lieu de 3 heures, ce qui nous a permis d'obtenir un meilleur rendement en déoxyribonucléosides-5'-phosphate. Nous avons utilisé la DNAse pancréatique de la Worthington Biochemical Corporation et préparé la phosphodiestérase à partir du venin brut de Crotalus Adamanteus d'après la méthode de SINSHEIMER et KOERNER (1952).

La méthode de chromatographie employée est celle de HURLBERT et coll. (1954) modifiée par CANELLAKIS et MANTSAVINOS (1948) en ce qui concerne le pH du tampon formiate d'élution. L'hydrolysat est adsorbé sur une colonne de Dowex 1 x 2, 200/400 qui a été préalablement traitée par le formiate de sodium et l'acide formique et équilibrée avec de l'eau, les nucléotides sont séparés par élution avec un gradient exponentiel de formiate d'ammonium de concentration comprise entre 0 et 0,5 M à pH 4,25. Les densités optiques des fractions sont lues à 250, 260, 275 et 280 mμ au spectrophotomètre Zeiss dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique avec de l'eau distillée comme référence. Le rapport des absorptions à 275 sur 260 mμ est caractéristique de chaque nucléotide. Dans ces conditions, nous avons obtenu une bonne séparation des nucléotides (Fig. 8a). La récupération du matériel absorbant à 260 mμ, contenu dans l'hydrolysat, est de l'ordre de 50 % à 92 %. Dans

le cas de l'échantillon analysé fig. 8b (V 202), nous avons ainsi récupéré 91 % du matériel absorbant à 260 mμ, dont 80 % sous forme de nucléotides, et 11 % sous forme de nucléosides qui s'éluent lors du rinçage de la colonne avec de l'eau.

4) Séparation et analyse par chromatographie sur gel de séphadex de la fraction dialysable obtenue après action de H_2O_2 sur le DNA

Après avoir fait agir l'eau oxygénée (ou l'acide persuccinique) sur le DNA, il convient, pour analyser le mélange réactionnel, de séparer entre eux les sels (utilisés pour obtenir une force ionique suffisante), le DNA dégradé, et une fraction dialysable constituée par des dérivés du DNA de petite masse. La première méthode que nous avons utilisée consistait à dialyser le mélange plusieurs fois contre de l'eau. Cette méthode est pratique pour isoler le DNA, mais elle nécessite un traitement ultérieur par adsorption sur du charbon actif pour séparer dans la fraction dialysable les sels des dérivés du DNA. Ce dernier traitement entraînant des pertes, nous l'avons abandonné. Il est en effet apparu bien préférable d'utiliser un gel de séphadex qui permet de réaliser la séparation des trois fractions en une seule opération.

La méthode utilisée est celle décrite par HOHN et POLLMANN (1963). 38 g de gel séphadex G 25 ont été lavés plusieurs fois à l'eau puis au carbonate d'ammonium 0,01 M pour enlever les particules les plus fines. Le gel a été abandonné pendant une nuit, puis chargé sur une colonne de 50 cm de hauteur et de 165 ml de volume, il a été rincé avec 1,9 litre de carbonate d'ammonium 0,01 à pH 9. La solution à analyser, provenant de 45 mg de DNA traité par H_2O_2, a été évaporée à 5 ml et déposée en haut de la colonne. L'élution a été faite avec une solution de carbonate d'ammonium 0,01 à pH 9. Les volumes auxquels s'éluent les différents composés (Ve) sont définis par la relation :

$$Ve = Vo + Kd\ Vi$$

où Vo est le volume extérieur aux grains de séphadex et Vi le volume intérieur. Kd est un coefficient qui indique la fraction du volume intérieur accessible à une molécule déterminée, ainsi Kd = 0 pour le DNA qui est une grosse molécule et Kd = 1 pour les sels. Dans le cas des bases et nucléosides du DNA, HOHN et POLLMANN (1963) ont trouvé des valeurs de Kd supérieures à 1, ils expliquent ce résultat par une adsorption de ces composés sur le gel de séphadex.

Nous avons suivi l'élution du DNA et de ses dérivés en mesurant les densités optiques des fractions à 230, 250, 260 et 280 mμ . L'élution du sel a été suivie par l'indice de réfraction mesurée sur un réfractomètre d'Abbe, (cf. Fig. 14). La récupération du matériel absorbant à 260 mμ a été de 100 %.

5) Chromatographie sur papier des bases, nucléosides et nucléotides

Nous en avons fait un double usage :

- qualitatif : pour détecter et essayer d'identifier les composés nouveaux formés par action des peroxydes et de H_2O_2 sur le DNA et ses constituants,

- quantitatif : pour évaluer la quantité de ces composés nouveaux par élution des taches chromatographiques et dosage spectrophotométrique des éluats. Nous avons toujours utilisé le papier Whatman n° 1 habituellement en chromatographie descendante, exceptionnellement en chromatographie ascendante.

Le tableau III indique les Rf moyens obtenus sur de nombreuses chromatographies de bases, nucléosides et nucléotides faites dans les 9 solvants utilisés. Nous avons surtout utilisé les solvant (1), (2), (6) et (9) qui permettent une bonne séparation des bases entre elles, et le solvant (8) qui permet de bien séparer les nucléotides des bases et des nucléo-

Tableau III

Valeurs moyennes des Rf obtenus pour différents composés puriques et pyrimidiques

Solvant		C	T	U	IsoB.	F.Py	A	G	H	A-1Nox
1) Isopropanol HCl 12 N Eau		0,51	0,78	0,69			0,41	0,28		
2) Butanol Acide Acétique Eau	4 1 1	0,39	0,63	0,51	0,38	0,28	0,56	0,29	0,43	0,49
3) Butanol Ethanol Eau	200 50 50	0,30					0,46	0,29	0,35	0,12
4) Butanol Ammoniaque (0,6 N)	6 1	0,27	0,50	0,31	0,02	0,12				
5) Butanol Ammoniaque(c) Eau	200 14 36	0,2?*	0,49*	0,29*			0,40*	0,11*	0,15*	
6) Propanol Ammoniaque(c) Eau	75 14 211	0,70	0,76		0,49	0,62	0,59	0,60	0,71	0,68
7) Isopropanol $SO_4(NH_4)_2$ 1 %	200 100	0,51					0,59			0,41
8) Propanol Alcool Tétra-hydrofurylique Citrate Tri-Potassique (0,08 M, pH 8)	100 50 50	0,50	0,68				0,55	0,48		0,32
9) Eau+NH_3 (pH 10)		0,65*	0,59*	0,65*		0,63*	0,35* 0,38	0,42* 0,40	0,59* 0,66	0,59
10) Eau distillée (pH 5,5)			0,69				0,38			0,64

Tableau III (suite)

Valeurs moyennes des Rf obtenus pour différents composés puriques et pyrimidiques.

	IsoG	8-OH A	6NHOH Pu.	CdR	TdR	UdR	AdR	GdR	AdR 1Nox	dCMP 5'	dTMP 5'	dAMP 5'	dGMP 5'	dAMP 1 Nox 5'	Im.C
1)		0,46		0,65	0,87					0,73	0,88				
2)	0,21	0,48	0,33								0,10				0,43
3)				0,33		0,43	0,44		0,20						
4)				0,25	0,47		0,41	0,14							0,32
5)															
6)		0,54	0,65				0,64								
7)	0,18			0,58			0,62		0,46						
8)				0,60	0,73		0,57	0,59	0,38	0,08	0,12	0,13	0,09		
9)	0,44					0,87	0,51	0,71							0,59
10)		0,29		0,	0,76		0,52		0,73			0,72		0,88	

Tableau III (légende)

1) G.R. WYATT, modifié (voir § II - 3).
2) et 3) D. DUNN, M.H. MAGUIRE and G.B. BROWN - J. Biol. Chem., 234, 620, (1959).
4), 8) et 10) R.J. BLOCK, E.L. DURRUM, G. ZWEIG - dans "A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis", Acad. Press Inc., New-York, Chap. IX, p; 206 (1955).
5) et 9) G.R. WYATT - dans "The Nucleic Acids, (E. CHARGAFF and J.N. DAVIDSON, eds.), Acad. Press, New-York, 1955, Vol. I, p. 252.
6) C.A. PONNAMPERUMA - Thèse, Berkeley, California, 1962.
7) M.A. STEVENS, D.I. MAGRATH, H.W. SMITH and G.B. BROWN, J.A.C.S., 80, 2755 (1958)

x : Rf dans la 2ème dimension (La chromatographie dans la 1ère dimension étant fait dans le solvant (1)).

C	: Cytosine	CdR	: Cytosine déoxyriboside
T	: Thymine	TdR	: Thymine déoxyriboside
U	: Uracile	UdR	: Uracile déoxyriboside
A	: Adénine	AdR	: Adénine déoxyriboside
G	: Guanine	GdR	: Guanine déoxyriboside

dCMP5' : Acide déoxycytidylique 5' - dTMP5' : Acide déoxythymidylique 5' - dAMP5' : Acide déoxyadénylique 5' - dGMP5' : Acide déoxyguanylique 5' - A-1-N-ox : Adénine 1-N-oxyde - AdR 1-N-ox : Adénine déoxyriboside 1-N-oxyde

H	: Hypoxanthine
8-OH-A	: 8-Hydroxyadénine
Iso. G	: Isoguanine
6NHOHPu	: 6-Hydroxylaminopurine
F. Py.	: 4,6 diamino-5-formamidopyrimidine
Iso. B	: Acide isobarbiturique
Im. C	: 4-amino-5-imidazole carboxamide.

III - Méthodes physiques

1) Diffusion de la lumière

Cette technique a été décrite et discutée en particulier par SADRON (1954) et BENOIT (1963). Les problèmes posés par son emploi pour l'étude des solutions de DNA ont été plus particulièrement envisagés par SADRON (1959 et 1961).

Les mesures de l'intensité de la lumière diffusée par les solutions ont été effectuées sur les photogoniodiffusomètres de WIPPLER et SCHEIBLING (1954) et de Sofica à la longueur d'onde 546 mμ .

Les solutions de DNA (étudiées à quatre concentrations différentes) et le solvant, sont préalablement dépoussiérés par centrifugation dans une centrifugeuse Phywe pendant une heure à 14. 000 tours par minute. Les intensités diffusées I sont mesurées pour chaque concentration C du polymère (exprimées en g/ml), à des angles d'observation θ compris entre 30° et 150° (angle entre la direction de la lumière diffusée et la direction de la lumière incidente). La référence étant l'intensité diffusée à $\theta = 90°$ par un étalon de benzène.

Nous ne reviendrons pas ici sur la théorie de la diffusion de la lumière, déjà largement décrite et connue. Nous donnerons seulement la forme générale de l'expression de l'intensité diffusée, telle que nous aurons à l'utiliser :

$$\frac{HC}{I} = \frac{1}{M} P^{-1}(\theta) + 2BC \qquad (1)$$

H : Constante de l'ordre de 1,6 pour les solutions de DNA

M : Masse moléculaire du polymère. Dans le cas où l'échantillon est polydisperse, on mesure la masse moléculaire moyenne en poids $\overline{M}_w$

B : 2ème coefficient du viriel, il est généralement nul pour les solutions de DNA

$P(\theta) := \frac{I(\theta)}{I(0)}$ c'est le rapport des intensités diffusées à l'angle θ et à angle nul, cette quantité dépend de la géométrie de la particule diffusante.

A - Détermination de la masse moléculaire

L'expression (1) montre que l'on obtient la masse moléculaire à partir d'une double extrapolation à angle nul et à concentration nulle des valeurs de HC/I (Zimmplott). On admet généralement que l'erreur commise sur la détermination des masses moléculaires du DNA par cette méthode est de l'ordre de 5 à 10 % si $\overline{M}_w = 4.10^6$.

B - Détermination du rayon de giration

Aux petits angles d'observation, on peut écrire :

$$P^{-1}(\theta) \simeq 1 + \frac{\overline{\rho^2}}{3} h^2$$

Cette relation est tout-à-fait générale, elle ne dépend pas du modèle géométrique choisi pour la particule.

$\overline{\rho^2}$ est le carré (de moyenne z) du rayon de giration de la particule.

$h = \frac{4\pi n}{\lambda_o} \sin \theta/2$, n étant l'indice de réfraction du solvant, il est peu différent de 1,33 indice de l'eau.

Pratiquement, la pente à l'origine p_o obtenue dans le Zimmplott par le tracé de $P^{-1}(\theta)$ en fonction de $\sin^2 \theta/2$ permet de calculer directement le rayon de giration de la particule par la relation :

$$\sqrt{\overline{\rho^2}} = 567 \sqrt{p_o}.$$

c'est celle que nous avons utilisée.

C - Détermination de la masse par unité de longueur

Pour un mélange de bâtonnets homogènes rigides, de longueur L, HOLTZER (1953) a calculé le comportement asymptotique de $P(\theta)$ pour hL grand.

$$P(\theta)_{hL\to\infty} = \pi/hL - 1/h^2L^2$$

Compte tenu de (1), on voit que si on représente la quantité $(Ih/\pi HC)_{C=0}$ en fonction de h (ou de sin $\theta/2$), la courbe obtenue tend par valeurs inférieures vers une asymptote horizontale d'ordonnée M/L. On calcule que la valeur asymptotique n'est effectivement atteinte que si $L > 1.400$ Å c'est-à-dire pour des bâtonnets de DNA de masse $M > 280.000$.

LUZZATI et BENOIT (1961) ont généralisé ce résultat au cas d'un bâtonnet présentant plusieurs points de repliements (Zig Zag chain ou chaîne filiforme). Ils ont montré que dans ce cas la courbe définie ci-dessus tend vers l'asymptote par valeurs supérieures, c'est ce qui a été effectivement observé avec le DNA natif.

Pour obtenir des valeurs convenables de M/L il est préférable d'effectuer les mesures en force ionique faible : dans ces conditions, les répulsions entre les différentes charges négatives portées par les phosphates de la chaîne de DNA se font sentir à une plus grande distance (l'atmosphère de DEBYE de chaque ion étant plus grande), ceci a pour conséquence de tendre la chaîne et de la rendre assimilable à un bâtonnet sur une longueur suffisante pour que l'extrapolation soit valable. Inversement, en force ionique grande, une valeur de M/L plus grande que 200 Å (valeur correspondant à la double hélice de CRICK et WATSON) indique, dans la mesure où elle est valable, un repliement assez important de la chaîne.

D - Etude cinétique de la dégradation du DNA par H_2O_2

Pour déterminer la diminution de la masse moléculaire au cours du temps, nous avons laissé évoluer le DNA au contact de l'eau oxygénée dans les cellules à diffusion, ce qui nous a empêché d'extrapoler les résultats en fonction de la concentration en DNA. Pour pouvoir les interpréter, nous avons donc été amenés à admettre que le 2ème coefficient du viriel était nul ou du moins qu'il restait constant pendant la dégradation.

Pour effectuer les mesures portant sur le début de la cinétique, il était nécessaire de définir le temps zéro avec précision et d'opérer à une température bien définie et constante. Nous avons opéré de la façon suivante : les solutions de DNA sont centrifugées puis pipetées dans les cellules de mesure. Les cellules et le photogoniodiffusomètre sont amenés à la température désirée. On mesure alors la masse moléculaire $\overline{M}_w(0)$. Au temps pris comme origine de la cinétique, les solutions de DNA, contenues dans les cellules de mesure, sont versées dans d'autres cellules, identiques, où ont été préalablement placées de petites quantités (moins de 0,1 ml) d'eau oxygénée concentrée et dépoussiérée par centrifugation. On assure ainsi un mélange homogène en évitant l'introduction de poussières.

2) Courbes de transition du DNA

Le DNA en solution se dénature par chauffage, cette dénaturation, qui est due à la désorganisation de la structure secondaire du DNA, se manifeste par un effet hyperchromique qui dépend de la température, du pH et de la force ionique du milieu. Nous avons toujours effectué les mesures en NaCl 0,15 M à pH 5,5.

Nous avons utilisé les montages réalisés au laboratoire par J. POUYET sur les spectrophotomètres Zeiss et Lerès. Dans le premier montage, les cellules hérmétiques en quartz (témoin et mesure) sont chauffées progressivement, en 50 minutes environ, jusqu'à 100° dans un four électrique. La température est enregistrée de façon continue par un thermocouple plongeant dans la solution et relié à un milivoltmètre préalablement étalonné. La densité optique est déterminée toutes les trois minutes. A partir des valeurs obtenues, on porte en fonction de la température la valeur du rapport :

$$\frac{DO(t)}{DO(20°)} \cdot \frac{v(t°)}{v(20°)}$$

qui représente l'augmentation relative réelle de densité optique (DO) compte tenu des variations de volume v de la solution en fonction de la température.

Dans un deuxième montage, un enregistreur xy permet d'enregistrer directement, en continu, la densité optique, en fonction de la température. On effectue sur les courbes la correction correspondant à la dilatation de l'eau.

Les températures de fusion du DNA de thymus de veau que nous avons ainsi obtenues se sont avérées reproductibles à $\pm$ 0,5° près.

3) Sédimentation

Cette technique a été décrite et discutée par SCHACHMAN (1959). Les mesures ont été faites par Mme G. POUYET à l'aide d'une ultracentrifugeuse analytique Spinco modèle E par la méthode d'absorption U.V. à 260 mμ . Nous avons effectué les sédimentations classiques pour la détermination de s et de g(s). Pour évaluer des ruptures cachées, pouvant exister dans le DNA natif, nous avons aussi effectué des sédimentations de bande en milieu alcalin selon la méthode de VINOGRAD et

coll. (1963). Cette méthode a déjà été utilisée par YOUNG et SINSHEIMER (1965) pour évaluer les ruptures cachées existant dans le DNA natif de ØX 174. Ces auteurs ont effectué les sédimentations en chlorure de césium alcalin au lieu de chlorure de sodium alcalin comme VINOGRAD.

La constante de sédimentation S d'une particule dépend de la masse, de la densité et de la configuration de cette particule. Dans un échantillon polydisperse on mesure une valeur moyenne de S. La fonction g(S), qui représente la distribution des S, est définie comme étant la fraction dc/c_o du soluté qui sédimente entre S et S + dS:

$$g(S) = \frac{1}{c_o} \frac{dc}{dS}$$

c_o étant la concentration totale du soluté

g(S) correspond à la distribution des S observés exprimentalement dans le cas où la diffusion brownienne est négligeable. Ce phénomène de diffusion n'étant pas, en général, négligeable (cas des petites masses), on élimine son effet en extrapolant les valeurs de g(S) à temps infini. Ceci provient du fait que l'élargissement de la courbe provenant de la diffusion est proportionnel à $\sqrt{t}$, alors que celui qui est dû à la sédimentation est proportionnel à t.

g(S) dépend à la fois de la polydispersité des masses et de la polydispersité des configurations ; cette dernière fonction étant mal définie et mal connue, SUEOKA (1959) a été amené à négliger son influence (ce qui semble valable, au moins dans l'étude d'une série homologue d'échantillons), pour déterminer les distributions des masses moléculaires f(M) à partir des g(S) en partant de leurs définitions :

$$\frac{dc}{c_o} = g(S)dS = f(M)dM$$

L'expérience montre que l'on peut relier les constantes de sédimentation d'une solution de macromolécules à sa masse moléculaire moyenne en poids $\overline{M}_w$ par la formule empirique :

$$S = KM^{\alpha}$$

où K et α ont des valeurs sensiblement constantes dans de larges domaines de masses.

Ainsi EIGNER et DOTY (1965) ont trouvé les relations suivantes en se basant sur un très grand nombre de résultats expérimentaux :

$$S^{\circ}_{20,w} = 0{,}116\ M^{0{,}325} \quad \text{pour} \quad 3.10^5 < M < 4.10^6$$

$$S^{\circ}_{20,w} = 0{,}034\ M^{0{,}405} \quad \text{pour} \quad M > 4.10^6$$

Dans la mesure où l'on peut appliquer les relations ci-dessus aux expressions définissant les masses moléculaires moyennes en nombre $\overline{M}_n$ et en poids $\overline{M}_w$ (c'est-à-dire dans la mesure où l'influence de la polydispersité en configuration est faible, ce qui est sans doute valable pour $M < 4.10^6$), il est possible d'évaluer le rapport $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ permettant une estimation de la polydispersité de l'échantillon étudié (SUEOKA (1959)).

$$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} = \frac{\left[\int S^{1/\alpha}\, g(S)\,ds\right]\left[\int S^{-1/\alpha}\, g(S)\,ds\right]}{\left[\int g(S)\,ds\right]^2}$$

(Nous avons ainsi trouvé pour l'échantillon de DNA V 268 natif la valeur de 1,87 indiquant que la distribution des masses est proche de la valeur statistique).

4) Diffusion centrale des RX

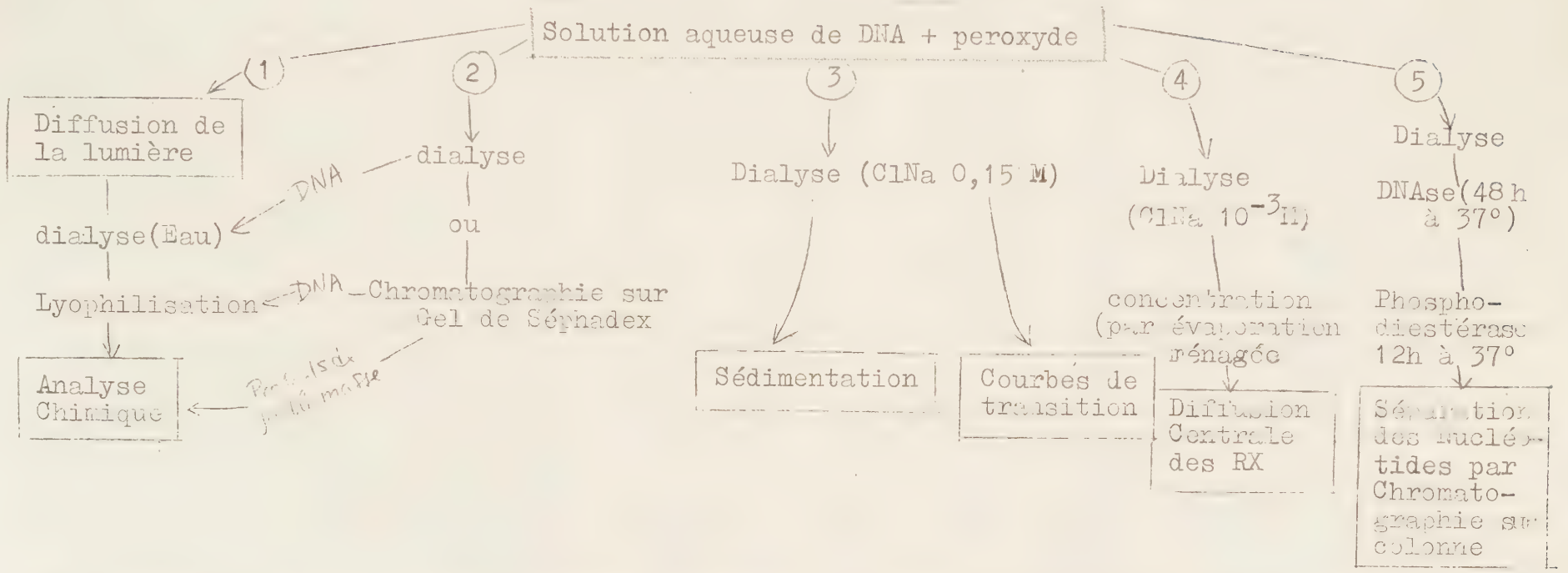
Les mesures ont été faites par MATHIS. Nous avons utilisé cette technique pour suivre la variation à courte échelle de la structure secondaire de nos échantillons de DNA traités par l'acide persuccinique. Nous ne parlerons pas ici de cette technique étant donné que quelques mesures seulement ont été effectuées.

Les différentes méthodes utilisées dans l'étude de l'action des peroxydes sur le DNA sont rassemblées dans le Tableau IV avec les traitements (dialyse, concentration) permettant l'utilisation des échantillons peroxydés.

Un même échantillon de DNA a généralement été étudié parallèlement du point de vue de ses propriétés chimiques et physico-chimiques de façon à mettre en rapport ces différents types de données.

Tableau IV

Schéma des opérations effectuées sur les DNA traités par les peroxydes



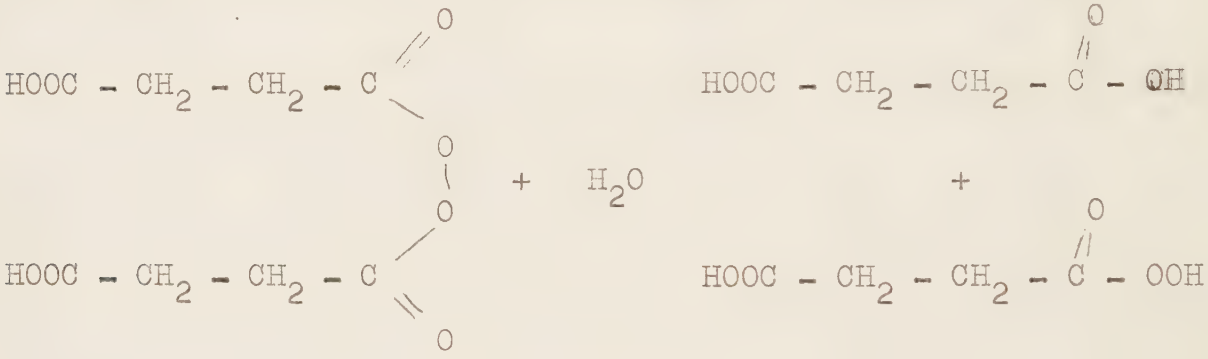
Le processus 1 a été suivi avec tous les peroxydes utilisés. 2 et 3 n'ont été suivis qu'avec l'acide persuccinique et H_2O_2 tandis que 4 et 5 n'ont été suivis qu'avec l'acide persuccinique.
Le DNA (thymus de veau) a été traité à des concentrations variant de 0,05 à 1 mg/ml, par des peroxydes en grand excès (leur concentration, rapportée à 1 nucléotide du DNA variait entre 3 et 100 moles d'acide persuccinique et entre 30 et 60 moles de H_2O_2). Les temps d'action étaient de l'ordre de 24 h à 37° pour l'acide persuccinique et variaient entre 0 et 1.000 heures à la température ordinaire ou à 37° pour H_2O_2.

CHAPITRE II

ACTION DE L'ACIDE PERSUCCINIQUE SUR LE DNA ET SES CONSTITUANTS*

I - Action sur les bases et les désoxyribonucléotides. Décomposition du peroxyde

En solution aqueuse, le peroxyde de disuccinoyle est rapidement hydrolysé en acide succinique et persuccinique :



Nous avons vérifié que cette hydrolyse est pratiquement instantanée dès la dissolution (dosage par la méthode au sulfure de diphényle en milieu aqueux (voir chap. I § II) (1). Nous avons aussi vérifié que le peroxyde de dissuccinoyle anhydre ne contenait pas de peracide préexistant (dosage par la méthode au sulfure de diphényle en milieu anhydre) et pratiquement pas d'eau oxygénée (dosage par le sulfate cérique).

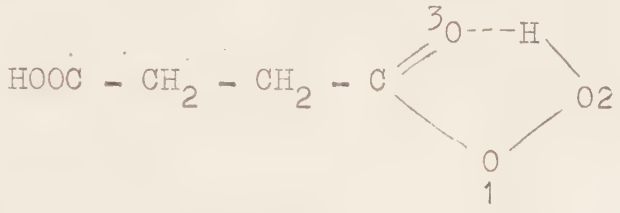
L'acide persuccinique peut à son tour réagir sur l'eau pour donner de l'acide succinique et de l'eau oxygénée ou de l'oxygène.

---

* Cette étude a fait l'objet de deux publications :
M.R. CHEVALLIER, H. SCHWEITZ et D. LUZZATI (1959) et
D. LUZZATI, H. SCHWEITZ, M.L. BACH et M.R. CHEVALLIER (1961).

Dans tout ce qui suit nous parlerons donc d'acide persuccinique pour indiquer l'espèce active et de peroxyde de disuccinoyle pour indiquer les concentrations de peroxyde utilisées en mg/ml (la concentration molaire étant évidemment la même).

L'acide persuccinique existe, comme tous les peracides sous une forme chélatée (SWERN et coll. 1955).



L'existence du pont hydrogène intramoléculaire à des conséquences intéressantes :

- Le peracide est moins acide que l'acide correspondant ainsi que nous l'avons vérifié.
- Les peracides ont tendance à réagir en libérant l'oxygène 2, l'hydrogène acide reformant une liaison vraie avec l'oxygène 3 (BLUM 1959).

L'oxygène libéré est très réactif, en particulier il réagit avec les oléfines en formant des époxides. Cette réaction faisant intervenir la double liaison éthylénique, il est permis de penser que des réactions analogues peuvent se produire avec les bases puriques et pyrimidiques.

Etant donné que l'acide persuccinique est susceptible de réagir avec l'eau pour donner de l'eau oxygénée qui peut elle-même réagir sur le DNA et ses dérivés, nous avons effectué une série d'expériences dans lesquelles nous avons suivi au cours du temps, à deux pH différents, la décomposition du peracide et la formation d'eau oxygénée en même temps que l'action du mélange oxydant sur les bases et les nucléotides. Pour ces expériences nous nous sommes placés dans des conditions

où le peroxyde est utilisé en grand excès pour faciliter l'étude de la dégradation des bases et des nucléotides. Le temps zéro de la réaction est déterminé par l'addition de peroxyde de disuccinoyle aux solutions de bases, de nucléotides (ou de DNA), les conditions expérimentales étant les suivantes :

Peroxyde de disuccinoyle : C = 1 mg/ml ($0,43.10^{-2}$ M).
Bases ou nucléotides : C = $0,8.10^{-4}$ M
Tampon succinate : $0,5.10^{-2}$ M à pH 4,3 ou
Tampon phosphate : 0,1 M à pH 7.

Les solutions sont mises à 37°, à l'abri de la lumière. Des échantillons sont prélevés toutes les 10 heures à pH 4 et toutes les 3 à 5 heures à pH 7. Les bases présentes sont dosées par spectrophotométrie U.V. à 250, 260, 280 mμ et à la longueur d'onde d'absorption maximum de la base considérée. Le pouvoir oxydant total a été dosé par iodométrie, et l'eau oxygénée formée, par le sulfate cérique (cf. chap. I, § II, 1). L'acide persuccinique étant déterminé par différence.

1) Décomposition de l'acide persuccinique

A - En absence de bases ou de nucléotides

Le logarithme de la concentration en peracide décroît linéairement en fonction du temps, la cinétique de décomposition est donc du 1er ordre par rapport au peracide, de la forme :

$$C = C_0 \, e^{-t/\theta}$$

A pH 7 la décomposition est 7 fois plus rapide qu'à pH 4,3 (θ = 4,6 heures au lieu de 33 heures) et il se forme très peu d'eau oxygénée : 5 % du pouvoir oxydant initial (Fig. 1).

Figure 1

Décomposition à pH 7 de l'acide persuccinique en absence et en présence de bases

Peroxyde de disuccinoyle : 1 mg/ml
Bases : $0,8 \cdot 10^{-4}$ M
Tampon phosphate à pH 7 : 0,1 M
Les solutions sont maintenues à 37° et à l'obscurité.

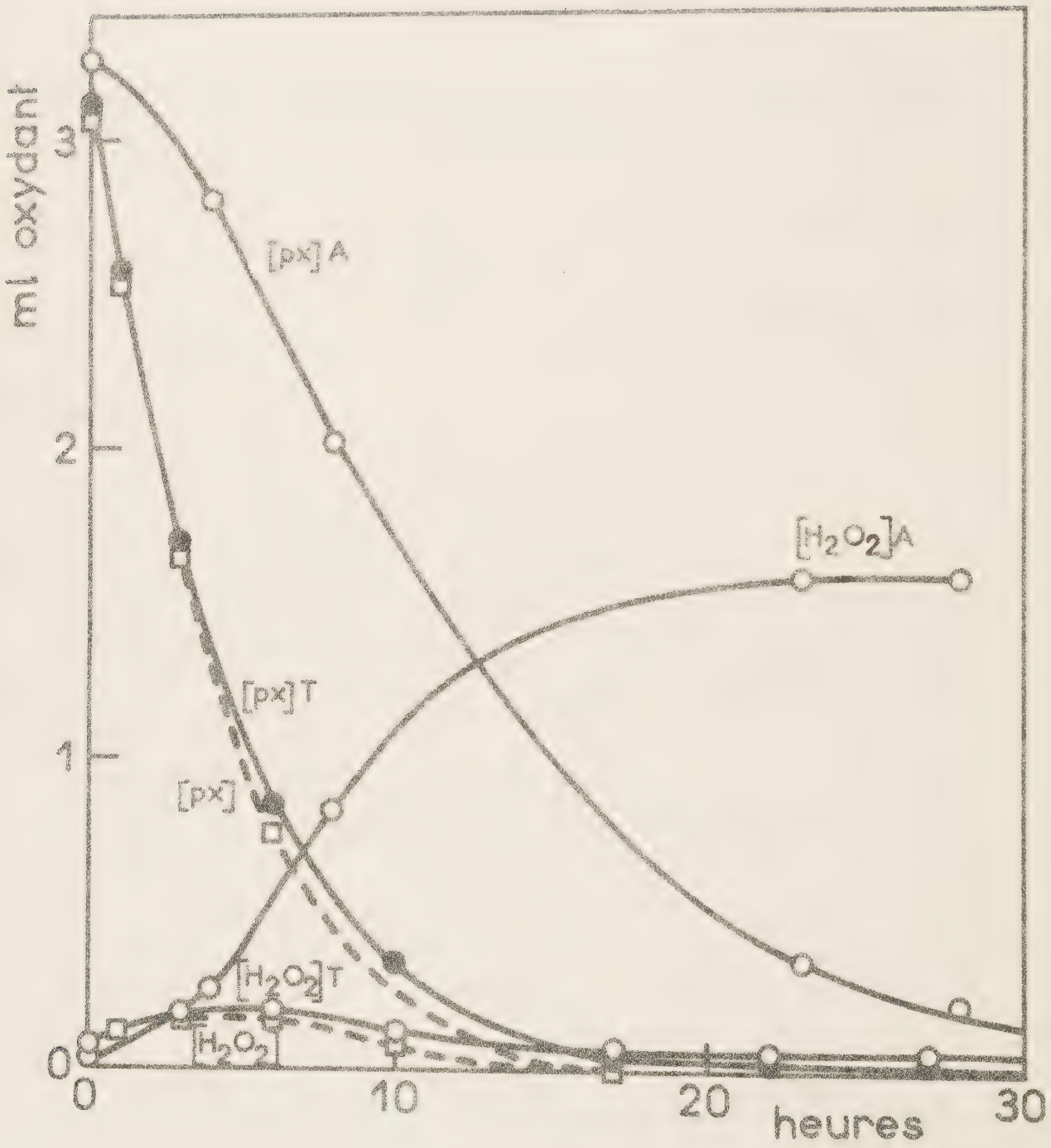
Figure 1a

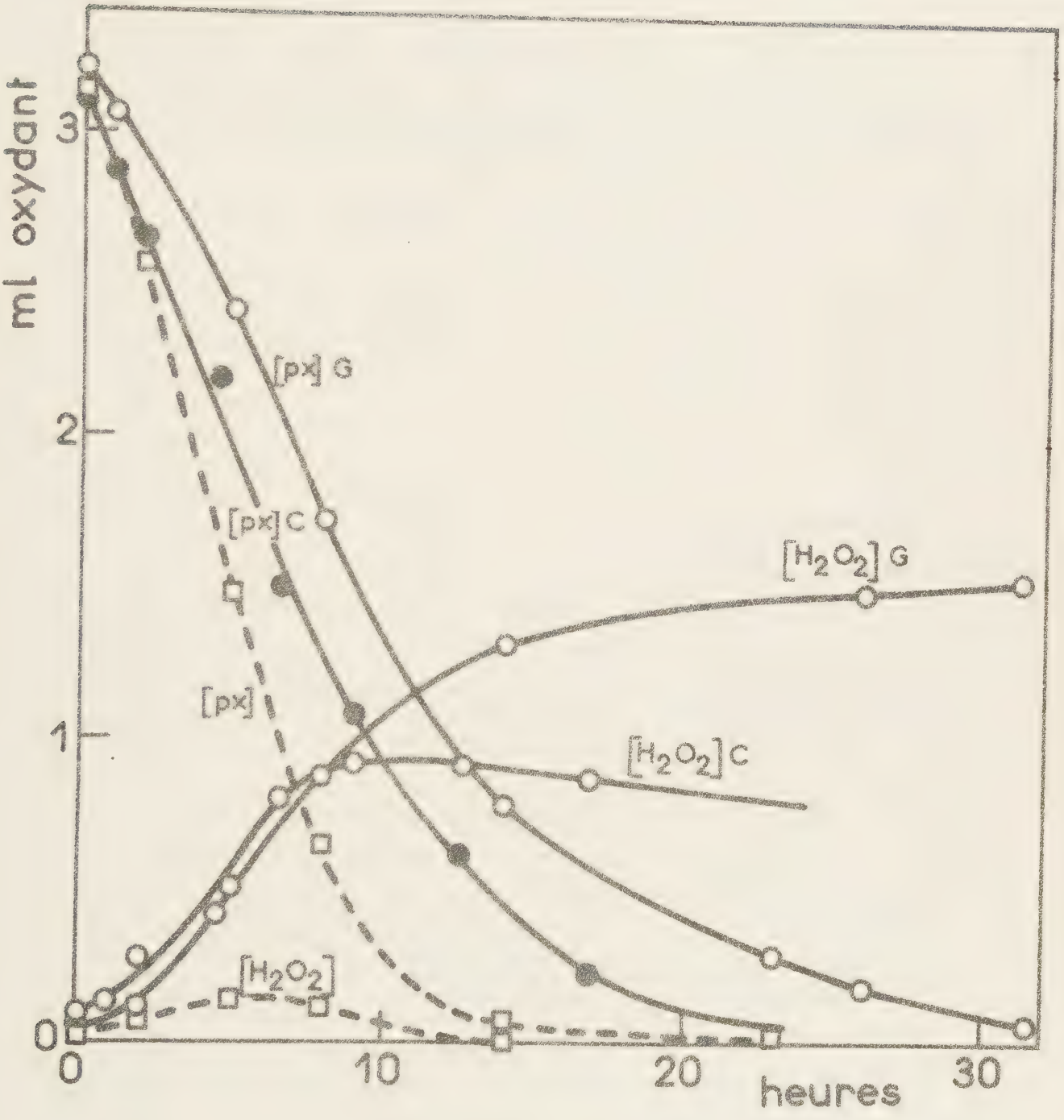
Diminution de la concentration en acide persuccinique en absence de bases ajoutées (px), et en présence d'adénine (px)A ou de thymine (px)T.

Formation d'eau oxygénée : En absence de bases ajoutées (H_2O_2) et en présence d'adénine (H_2O_2)A ou de thymine (H_2O_2)T

Figure 1b

Mêmes mesures avec la guanine (G) et la cytosine (C).


ml oxydant
3
2
1
0
[px]A
[px]T
[px]
[H2O2]A
[H2O2]T
[H2O2]
0
10
20
30
heures


ml oxydant
3
2
1
0
0
10
20
30
heures
[px] G
[px] C
[px]
[H2O2] G
[H2O2] C
[H2O2]

A pH 4,3 la décomposition est lente et il se forme beaucoup plus d'eau oxygénée qu'à pH 7 : 90 % du pouvoir oxydant initial au bout de 100 heures (Fig. 2).

B - En présence de bases ou de nucléotides

A pH 7 toutes les bases utilisées inhibent la décomposition du peracide et favorisent la formation d'eau oxygénée dans des proportions considérables, l'efficacité de cette action se fait dans l'ordre :

A, G, X > H > C > 5 MC > U > T (Fig. 1a et 1b)

L'action des 4 nucléotides du DNA est la même que celle des bases correspondantes.

A pH 4,3 les 4 bases du DNA accélèrent au contraire la décomposition du peracide et inhibent la formation d'eau oxygénée, l'efficacité de cette action se faisant dans l'ordre :

T > C, U, G > A (Fig. 2a et 2b)

Si l'on met en rapport ces résultats avec la structure chimique des bases utilisées, il est possible de dire que dans nos conditions expérimentales (50 molécules de peracide pour une molécule de base), la concentration en agent oxydant présent dans la solution diminue moins vite :

- en présence de purines qu'en présence de pyrimidines,
- en présence de purines possédant un groupe $-NH_2$ en position 6 qu'en présence de purines possédant un groupe =O à la même position,
- en présence de pyrimidines possédant un atome d'hydrogène en position 5 qu'en présence de pyrimidines possédant un groupe méthyle à la même position (Fig. 3).

Figure 2

Décomposition à pH 4,3 de l'acide persuccinique en absence et en présence de bases

Peroxyde de disuccinoyle : 1 mg/ml
Bases : $0,8.10^{-4}$ M
Les solutions sont maintenues à 37° et à l'obscurité.

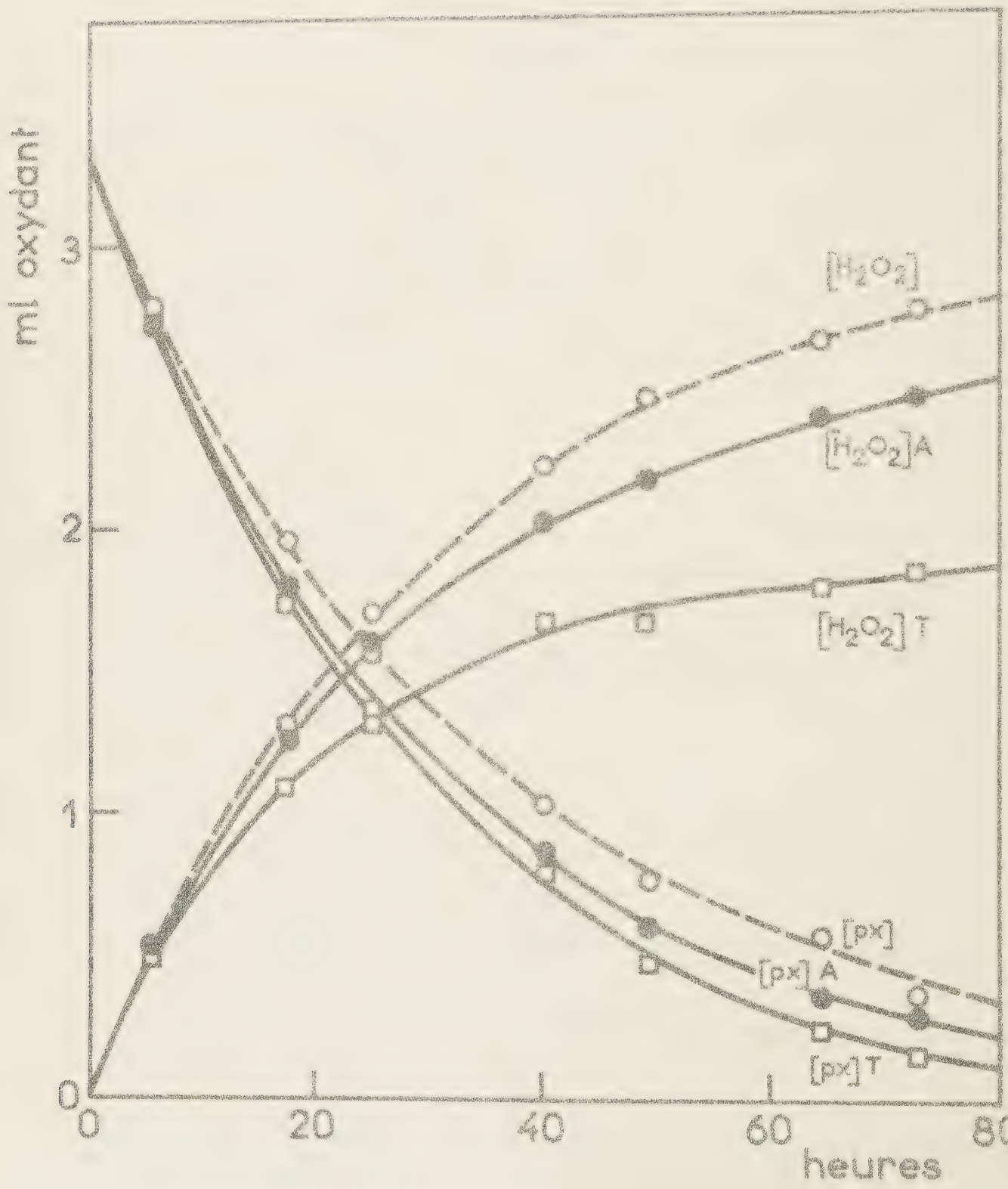
Figure 2a

Diminution de la concentration en acide persuccinique en absence de bases ajoutées (px) et en présence d'adénine (px)A ou de thymine (px)T.

Formation d'eau oxygénée en absence de bases ajoutées (H_2O_2) et en présence d'adénine (H_2O_2)A ou de thymine (H_2O_2)T.

Figure 2b

Mêmes mesures avec la guanine (G) et la cytosine(C).


ml oxydant
3
2
1
0
0
20
40
60
80
heures
[H2O2]
[H2O2]A
[H2O2]T
[px]
[px]A
[px]T

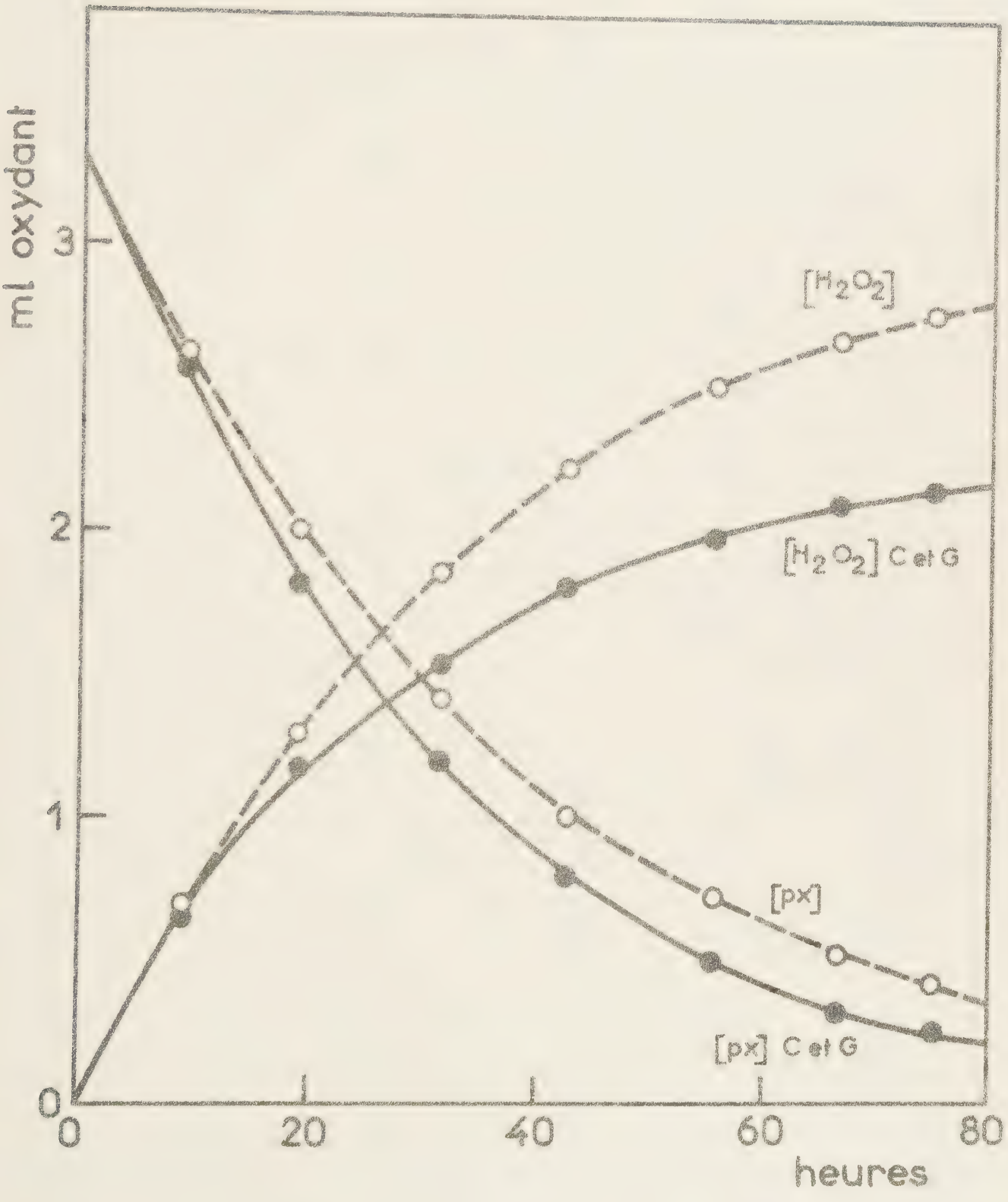
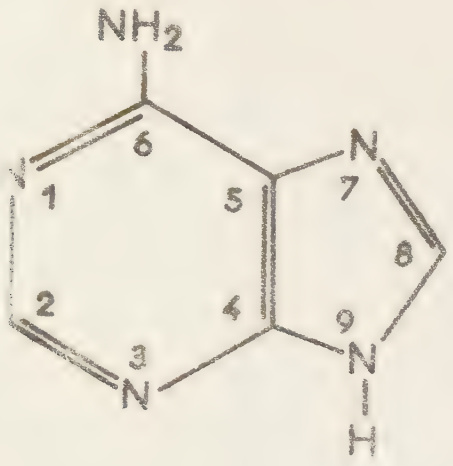
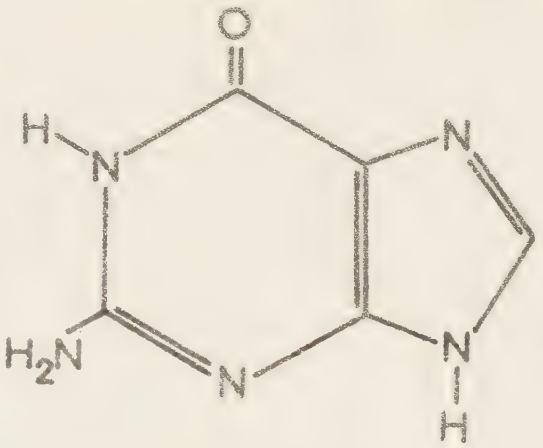

ml oxydant
3
2
1
0
0
20
40
60
80
heures
[H2O2]
[H2O2] Cat G
[pX]
[pX] Cat G

Figure 3

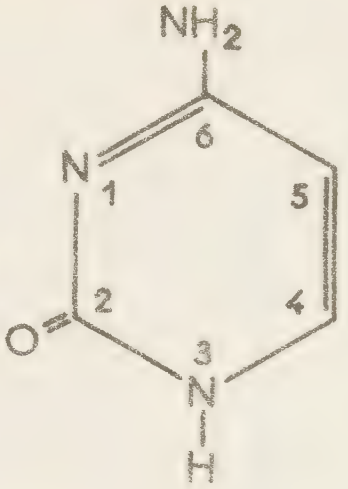
Forme tautomère "la plus probable" pour les bases et les nucléosides en solution aqueuse à pH neutre. (D'après STEINER et BEERS 1961).



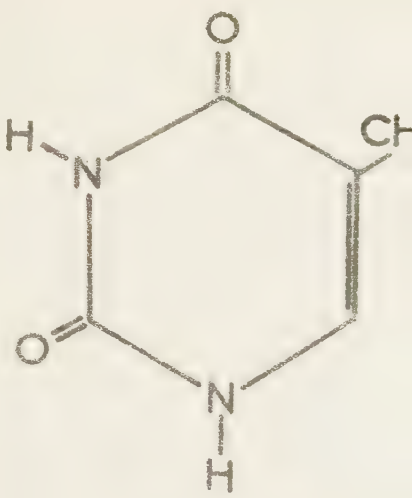
ADENINE



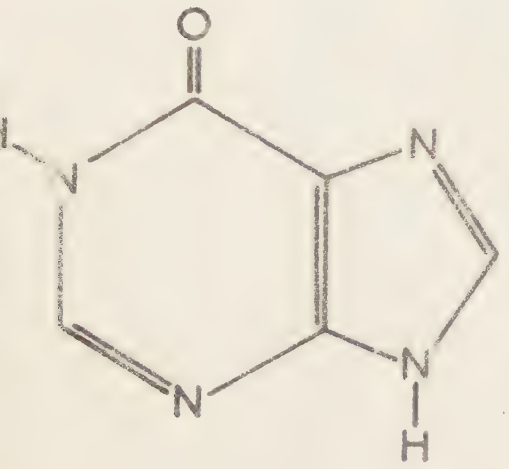
GUANINE



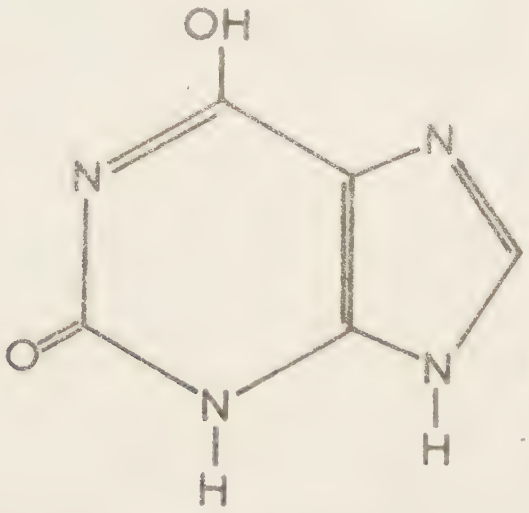
CYTOSINE



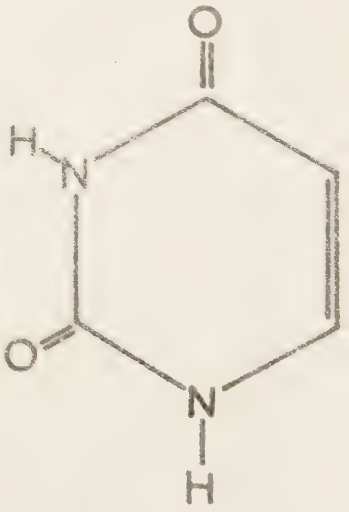
THYMINE



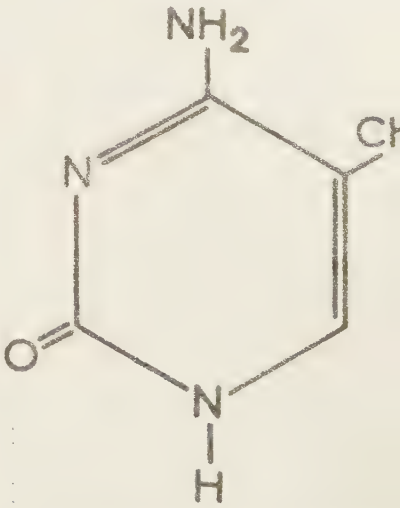
HYPOXANTHINE



XANTHINE



URACILE



5 METHYLCYTOSIN

2) Action sur les bases et les désoxyribonucléotides

Les densités optiques à 250, 260, 280 mμ et à la longueur d'onde d'absorption maximum des solutions de bases et de nucléotides traités dans les conditions indiquées ci-dessus montrent que, alors que le déplacement du spectre à ces longueurs d'onde est faible au cours de l'action du peracide, on constate, par contre, une diminution importante de l'absorption U.V., ce qui traduit une modification des cycles puriques et pyrimidiques pouvant aller de la saturation d'une double liaison à la rupture des cycles. Les figures 4 à 7 représentent les diminutions d'absorption U.V. à la longueur d'onde d'absorption maximum de la base en fonction du temps d'action de l'acide persuccinique à 37°. La fraction de densité optique restante correspond donc à peu près à la fraction de bases ou de nucléotides dont les cycles sont intacts. Dans ces conditions nous n'avons pas pu déceler la formation des 1-N-oxydes de l'adénine et de la cytosine, l'absorption maximum de ces composés se situant vers 230 mμ. Nous avons par contre pu mettre en évidence leur formation en utilisant la chromatographie après traitement dans d'autres conditions (voir plus loin).

A - Action sur les cycles puriques et pyrimidiques des bases libres

a) Dans les conditions standard indiquées ci-dessus

Influence du pH : Les purines (adénine et guanine) sont dégradées à la même vitesse à pH 7 qu'à pH 4,3, les pyrimidines par contre sont bien plus sensibles au peracide à pH 7 qu'à 4,3 (la cytosine 5 fois plus, la thymine et l'uracile 10 fois plus), (Fig. 4 et 5).

Influence de la nature du cycle et des groupements fonctionnels :

A pH 7 l'importance de la dégradation des bases décroît dans l'ordre : C > 5 MC > U > A, X > T > G, H (Fig. 5 et 6).

b) Dans des conditions douces

Afin de savoir si l'acide persuccinique est susceptible de former des 1-N-oxydes sur l'adénine et la cytosine, nous avons traité ces bases dans des conditions analogues à celles utilisées par CRAMER et SEIDEL (1963) dans l'action de l'acide perphtalique sur la cytosine.

De l'adénine et de la cytosine (4.10^{-3} M) sont mis au contact de l'acide persuccinique (16.10^{-3} M) pendant 22 heures à 20°. Le pH du milieu est maintenu à 7 par des additions périodiques de soude. Après action, 0,3 ml de chaque solution sont évaporés à 37° dans un courant d'azote et placés sur un papier chromatographique Whatman n° 1. Les chromatographies sont effectuées dans le mélange butanol/acide acétique/eau : 4/1/1.

L'adénine traitée se sépare en 4 taches de Rf 0,10 - 0,24 - 0,45 et 0,54 les deux premières sont très faibles, les deux dernières seules sont importantes. La troisième tache est de l'adénine 1-N-oxyde d'après son Rf et ses spectres aux pH 1 et 13 (en particulier le pic d'absorption caractéristique a été noté à 232 mμ à pH 13). La quatrième tache est de l'adénine d'après son Rf et son spectre à pH 1. En nous basant sur la valeur de ε_{max} à pH 13 donnée par STEVENS et BROWN (1958) pour l'adénine 1-N-oxyde, nous avons calculé que 95 % de l'adénine est ainsi transformée en adénine 1-N-oxyde et 5 % seulement n'est pas modifié.

La cytosine traitée se sépare en 3 taches, de Rf : 0,11 - 0,28 et 0,40. La première est très faible. La deuxième est la cytosine 1-N-oxyde d'après les spectres aux pH 1, 6,8

(suite p. 50).

Figure 4

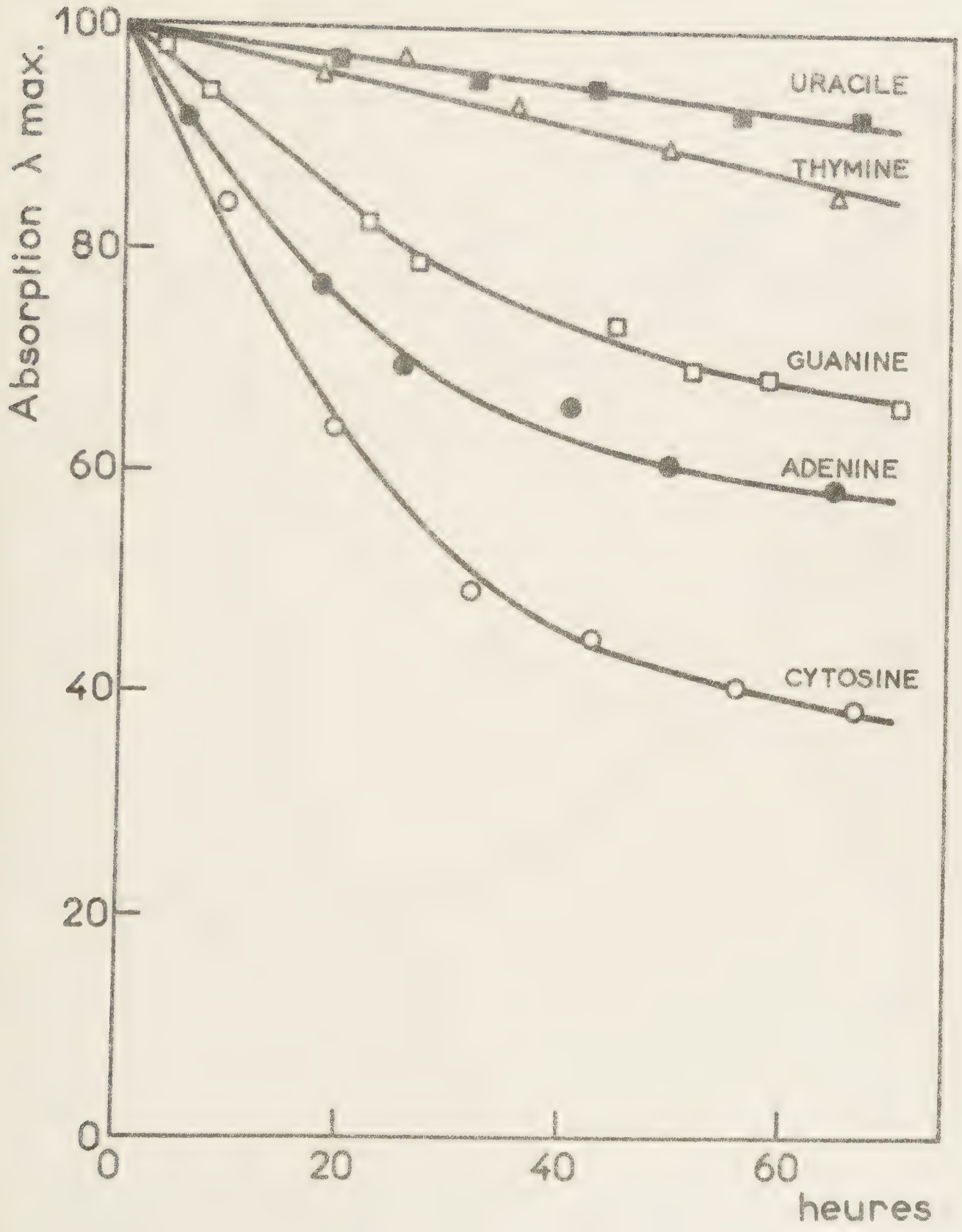
Décomposition des bases libres par l'acide persuccinique à pH 4,3

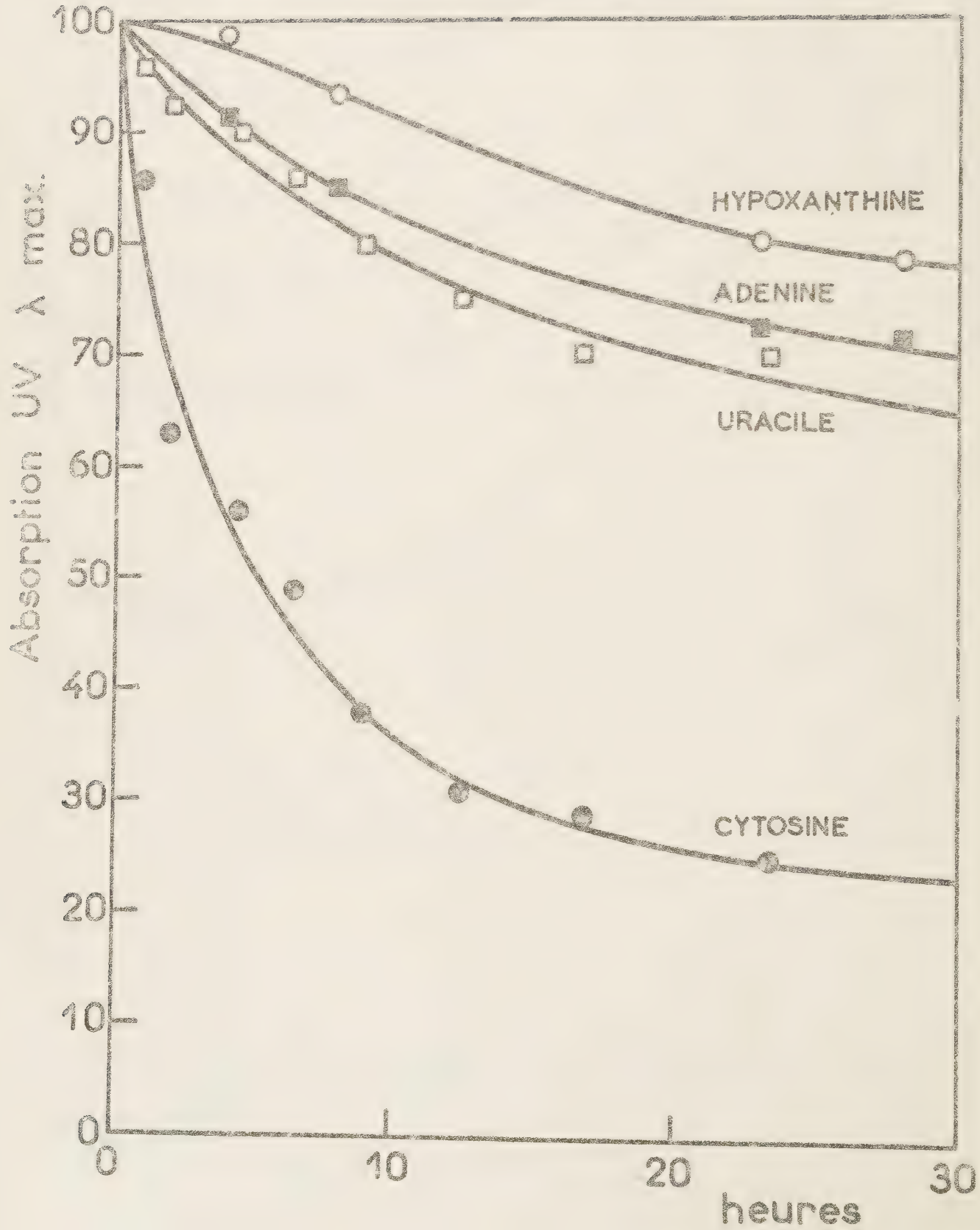
Bases : : $0,8.10^{-4}$ M
Peroxyde de disuccinoyle : 1 mg/ml = $4,3.10^{-3}$ M
Les solutions sont maintenues à 37° et à l'obscurité.

Figure 5 et 6

Décomposition des bases libres par l'acide persuccinique à pH 7

Bases : $0,8.10^{-4}$ M
Peroxyde de disuccinoyle : 1 mg/ml = $4,3.10^{-3}$ M
Tampon phosphate à pH 7 : 0,1 M
Les solutions sont maintenues à 37° et à l'obscurité.


Absorption λ max.
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
heures
URACILE
THYMINE
GUANINE
ADENINE
CYTOSINE


Absorption UV λ max.
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
heures
HYPOXANTHINE
ADENINE
URACILE
CYTOSINE

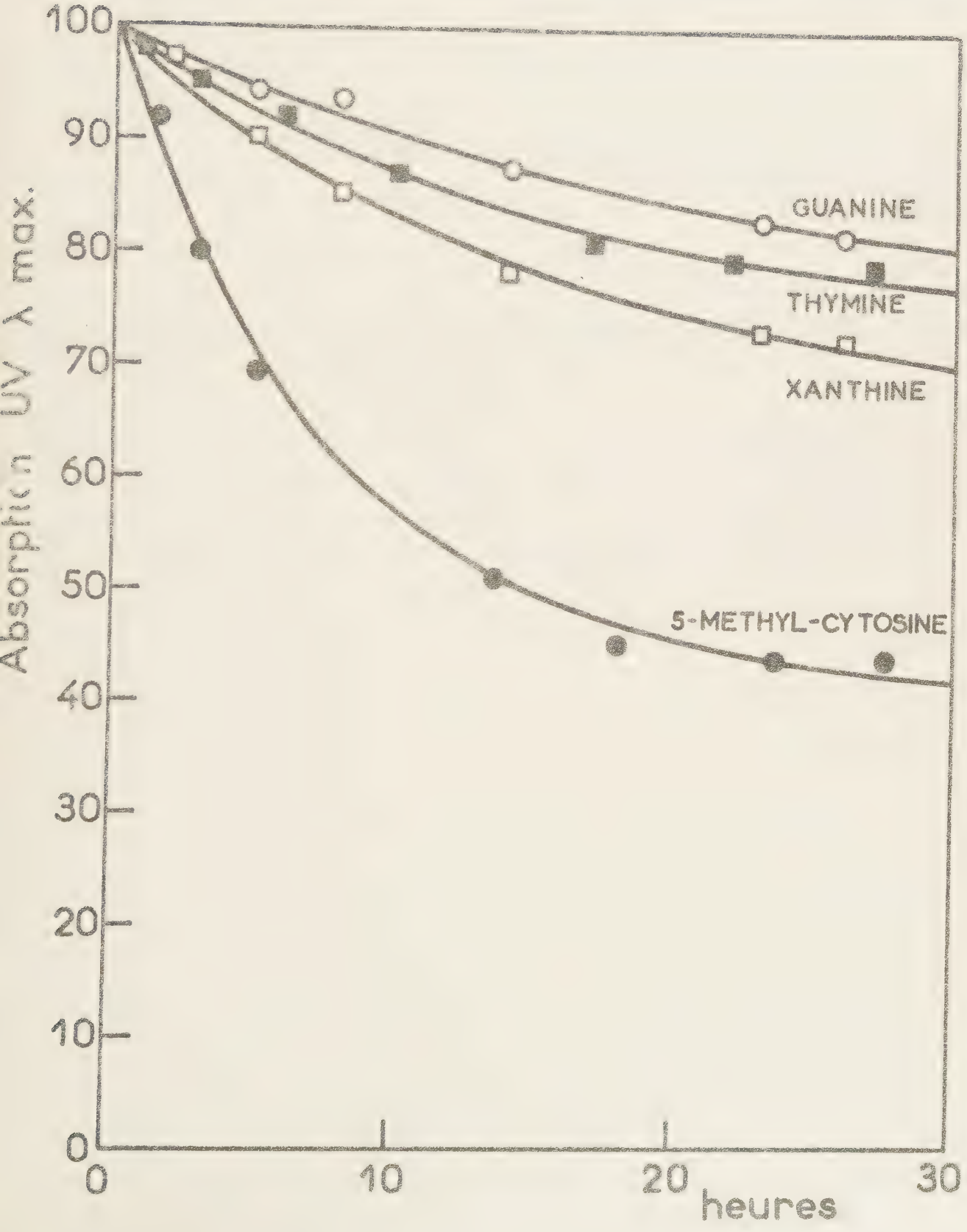
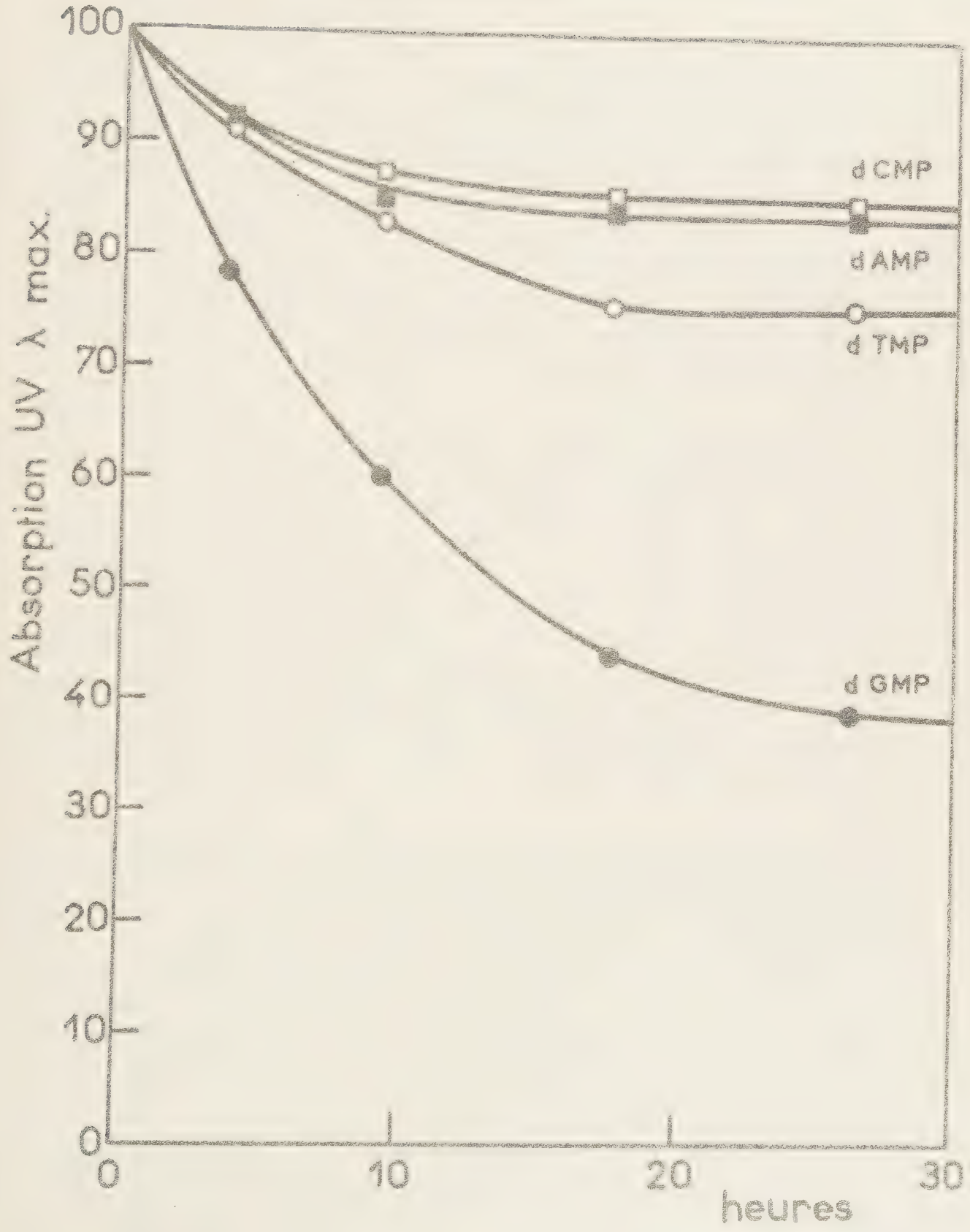

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Absorption UV λ max.
GUANINE
THYMINE
XANTHINE
5-METHYL-CYTOSINE
0
10
20
30
heures

Figure 7

Décomposition des déoxyribonucléotides 5' libres par l'acide persuccinique à pH 7

Déoxyribonucléotides 5' : $0,8.10^{-4}$ M
Peroxyde de disuccinoyle : 1 mg/ml = $4,3.10^{-3}$ M
Tampon phosphate à pH 7 : 0,1 M
Les solutions sont maintenues à 37° et à l'obscurité.


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Absorption UV λ max.
d CMP
d AMP
d TMP
d GMP
0
10
20
30
heures

et 13 (nous avons noté en particulier le pic d'absorption maximum à 218,5 mμ à pH 6,8). La troisième est de la cytosine d'après son Rf et son spectre à pH 7. En nous basant sur la valeur de ε_{max} de la cytosine 1-N-oxyde donnée par CRAMER et SEIDEL (1963) nous avons calculé que 72 % de la cytosine est transformée en cytosine 1-N-oxyde et 28 % seulement n'est pas modifié. Ces proportions seraient de 79 % et 21 % d'après la valeur de ε_{max} trouvée par GANGLOFF (communication personnelle).

B - Action sur les cycles puriques et pyrimidiques des déoxyribonucléotides libres

Les mesures n'ont été faites qu'à pH 7. On trouve que les sensibilités respectives des cycles de la cytosine et de la guanine sont radicalement inversées quand ces bases entrent dans une combinaison nucléotidique. Dans les mêmes conditions, l'acide déoxycytidylique (dCMP 5') est environ 5 fois moins sensible que la cytosine à l'action du peracide alors que l'acide déoxyguanylique (dGMP 5') l'est environ 5 fois plus que la guanine (Fig. 7).

C - Evaluation de la participation de H_2O_2 formée en cours de réaction dans l'effet de l'acide persuccinique sur les cycles des bases libres et sur ceux des déoxyribonucléotides

La dégradation des cycles puriques et pyrimidiques des bases et des nucléotides est en fait la superposition de l'action primaire de l'acide persuccinique et de l'action secondaire de H_2O_2 formée.

Nous avons essayé d'évaluer à pH 7 la contribution de H_2O_2 à cette dégradation en nous basant :

Tableau V

Evaluation de la fraction de bases et de nucléotides dégradés par l'eau oxygénée formée par la décomposition de l'acide persuccinique

Résultats expérimentaux % Bases dégradées		(Conc. d'agent oxydant)x (temps d'action)*		Estimation % bases dégradées	
(1) Par H_2O_2 seule	(2) Par le mélange peracide + H_2O_2	(3) H_2O_2	(4) Peracide	(5) par H_2O_2 formée	(6) par peracide seul *
Cytosine 29,5	74	0,211	0,345	6,2	67,8
Thymine 7,5	20	0,032	0,234	0,2	19,8
Adénine 0,5	26	0,269	0,520	0,1	25,9
Guanine 0,5	16	0,264	0,457	0,1	15,9
dCMP 20	14,5	0,071	0,287	1,4	13,1
dTMP 13	24	0,024	0,183	0,3	23,7
dAMP 3,5	16	0,228	0,593	0,8	15,2
dGMP 0	58,5	0,200	0,542	0	58,5

Conditions expérimentales : H_2O_2 : $C_o = 0,86.10^{-2}$ N : Valeur restant à peu près constante pendant la durée de l'expérience.(1) Peroxyde de disuccinoyle : $C_o = 0,86.10^{-2}$ N (1mg/ml(2)) : Valeur diminuant rapidement au cours du temps. Les valeurs moyennes entre t=0 et t=20 heures étant données dans la colonne (4).
Bases ou nucléotides : 8.10^{-5} M - Tampon phosphate : 0,1 M pH 7
Les solutions sont abandonnées pendant 20 h à 37° et à l'obscurité.
* Valeur de l'intégrale $\frac{1}{Co}\int_0^t C\,dt$ avec $Co = 0,86.10^{-2}$ N : concentration initiale de l'agent oxydant et C sa concentration instantanée, t = 20 heures durée de l'expérience. Les intégrales sont déterminées par planimètrie sur les figures 1a et 1b pour les bases. - ** Différence entre les valeurs de la colonne (2) et la colonne(5).

1°) Sur les courbes représentant la dégradation des bases et des nucléotides par le mélange acide persuccinique plus H_2O_2 (Fig. 5, 6 et 7) et par H_2O_2 seule (Figs. 12 et 13).

2°) Sur les courbes représentant les variations des concentrations en acide persuccinique et en H_2O_2 au cours du temps en présence des différentes bases (Fig. 1) ou nucléotides (non publié).

Nous avons admis que l'action de H_2O_2 est proportionnelle à l'aire comprise entre les courbes donnant à chaque instant la concentration en H_2O_2 dans le mélange réactionnel et l'axe des temps. On trouve ainsi qu'au bout de 20 heures à 37° et à pH 7, l'eau oxygénée formée ne contribue que pour 10 % dans la dégradation de la cytosine et de dCMP, pour 5 % dans celle de dAMP et pour 1 % au plus dans la dégradation des autres bases ou nucléotides (Tableau V).

En conclusion, la contribution à la dégradation des hétérocycles des bases et des nucléotides, de l'eau oxygénée formée par hydrolyse de l'acide persuccinique, est assez faible pour que l'on puisse en première approximation négliger son action.

D - Action de l'acide persuccinique sur les liaisons déoxyribose-phosphate et déoxyribose-base des déoxyribonucléotides

Ayant constaté que l'acide persuccinique dégrade les hétérocycles des déoxyribonucléotides 5', nous avons recherché s'il avait une action sur leurs liaisons déoxyribose-base ou déoxyribose-phosphate. Pour cela nous avons opéré en solution plus concentrée en nucléosides ou nucléotides pour faciliter une analyse chromatographique des produits obtenus.

Les conditions sont les suivantes :
Peroxyde de disuccinoyle : C = 10 mg/ml ($4,3.10^{-2}$ M)
Nucléotides : C = 16.10^{-4} M
Tampon succinate de sodium: 0,05 M à pH 7, les solutions sont laissées pendant 24 h à 37° à l'abri de la lumière.

Parallèlement nous avons suivi l'évolution d'échantillons témoins et d'échantillons traités par l'eau oxygénée seule. (Les résultats relatifs à l'action de l'eau oxygénée seront analysés au chapitre III).

Au bout de 24 heures, des échantillons de 0,5 ml sont partiellement évaporés à 40° sous courant d'azote, pour être chromatographiés sur papier avec le mélange (Alcool tétrahydrofurfurylique n-propanol-citrate de potassium) (Cf. Tableau VI) permettant d'obtenir une bonne séparation entre les nucléotides qui restent près de l'origine et les nucléosides ou bases qui migrent considérablement.

Les différentes taches obtenues sont éluées en tampon phosphate 10^{-2} M à pH 7,2 en vue de tracer leurs spectres U.V. Le tableau VI indique les Rf des différents composés séparés ainsi que leurs longueurs d'ondes d'absorption maximum et leurs concentrations relatives évaluées à partir de la densité optique des éluats. Les Rf et les spectres sont comparés à ceux des bases, nucléosides et nucléotides. On constate l'absence de composés ayant des Rf de bases ou de nucléosides.

Les composés résultant de l'action de l'acide persuccinique semblent tous être du type nucléotidique au moins dans les conditions utilisées.

L'acide déoxyadénylique est transformé à environ 60 % en un composé dont les spectres aux pH 2,7 et 12 ont permis de l'identifier comme étant le 1-N-oxyde correspondant grâce à son maximum d'absorption caractéristique à 230 mμ aux pH 7 et 12 (STEVENS et BROWN 1958), (suite p. 57).

Tableau VI

Libération des bases dans l'action de l'acide persuccinique et de l'eau oxygénée sur les désoxyribonucléotides

Traitement	Produit traité	Produits trouvés	R_f	λmax	DO_{260}	Volume Elution (ml)	$DO_{260}V$	%(DO.Volume Elution)
(A)								
0	dCMP		0,08	271,1	0,64	25	9,60	100 %
	CdR		0,61					
	C		0,50					
Acide persuccinique	dCMP	C 1	0,03	269,1	0,41	3	1,23	12,8 %
		C 2	0,05	269,0	0,78	1	0,78	8,1 %
		C 3	0,09	266,6	0,51	1	0,51	5,3 %
H_2O_2	dCMP	C'1	0,03	271,0	0,13	1	0,13	1,4 %
		C'2	0,06	271,1	1,01	3	3,03	31,5 %
		C'3	0,48	275,0	0,040	1	0,040	0,4 %
(B)								
0	dTMP		0,12	268,2	0,91	15	13,6	100 %
	TdR		0,73					
	T		0,68					
Acide persuccinique	dTMP	T 1	0,16			10		
		T 2*	0,28			3		
H_2O_2	dTMP	T'1	0,11	267,6	0,47	10	4,70	34,5 %
		T'2*	0,28	267,6	0,29	3	0,84	6,2 %
		T'3	0,70	264,5	0,114	1	0,11	0,8 %

Tableau VI (suite)

Traitement	Produit traité	Produits trouvés	R_f	λ max	DO_{260}	Volume Elution (ml)	$DO_{260} V$	% (DO x Volume Elution)
(C)								
0	dAMP		0,13	260,5	0,76	15	11,40	100 %
	AdR		0,57					
	A		0,54					
Acide persuccinique	dAMP	A 1	0,04	231,5	0,84	5	4,23	37,1 %
		A 2	0,10	261,0	0,15	3	0,45	4,0 %
H_2O_2	dAMP	A'1	0,10	261,0	1,22	10	12,20	(107 %)
		A'2	0,56	260,5	0,095	1	0,095	0,8 %
(D)								
0	dGMP		0,09	254	0,59	15	8,85	100 %
	GdR		0,59					
	G		0,48					
Acide persuccinique	dGMP	G 1	0,02	254	0,66	3	1,98	22,4 %
		G 2	0,09	255,6	0,67	3	2,01	22,6 %
H_2O_2	dGMP	G'1	0,03	254	1,64	5	8,20	92,7 %
		G'2	0,01	246	0,028**	1	0,028	0,3 %

Tableau VI (légende)

Traitement des nucléotides : nucléotides : $1,6.10^{-3}$ M - Peroxyde de disuccinoyle : 10 mg/ml = $4,3.10^{-2}$ M

H_2O_2 : $8,5.10^{-2}$ M

Tampon succinate 0,05 M pH 7 - 24 h à 37° à l'obscurité

Séparation des nucléotides et des bases libérées par chromatographie sur papier (Whatmann 1).

Solvant : Alcool tétrahydrofufurylique - alcool propylique - citrate de potassium 0,08 M pH 8 (1/2/1)

Elution des taches dans du tampon phosphate 0,01 M à pH 7,2.

* Tache observée avec la même intensité pour dTMP témoin

** Différence entre l'intensité de la tache de Rf = 0,51 obtenue après l'action de H_2O_2 (DO = 0,060) et l'intensité de la tache de même Rf observée sur le témoin incubé pendant le même temps, mais en absence d'eau oxygénée (DO = 0,032).

Les acides déoxycytidylique et déoxyguanylique ont été transformés respectivement en 3 et 2 dérivés nucléotidiques qui n'ont pas été identifiés. Leurs spectres à pH 7 entre 240 et 290 mμ ressemblent à ceux des nucléotides de départ et leurs Rf en sont très voisins. L'acide thymidylique ne semble pas être modifié. On note seulement la présence d'une 2ème tache (de Rf = 0,28) mais celle-ci existe avec la même intensité dans le témoin.

DISCUSSION

Les résultats rapportés dans ce chapitre montrent que la vitesse de décomposition du peracide dépend de plusieurs facteurs, en particulier du pH et de la présence des bases et des nucléotides dans le milieu réactionnel. Nous discuterons au chapitre consacré à l'eau oxygénée, l'influence de la nature des bases sur la vitesse de décomposition de l'acide persuccinique et de l'eau oxygénée.

L'eau oxygénée formée au cours de cette décomposition contribue très peu à la dégradation des cycles des bases et des nucléotides. Leur sensibilité à l'action du peracide dépend du pH, de la nature du cycle et de la nature des substituants.

En ce qui concerne l'action de l'acide persuccinique sur les bases et les nucléotides, il nous paraît possible, en examinant nos résultats à la lumière de quelques considérations générales concernant le mode d'action des oxydants, de préciser d'une part quels sont les sites préférentiels d'action, d'autre part, comment différents substituants modifient l'intensité de l'action dans ces sites.

Rappelons d'abord qu'un certain nombre de mesures ont consisté à suivre la diminution de l'absorption dans l'U.V. des bases et des nucléotides en fonction du temps d'action de l'acide persuccinique, or l'absorption U.V. des bases étant liée à la conjugaison des doubles liaisons dans les cycles, tout agent extérieur susceptible d'interrompre cette conjugaison causera une diminution de la densité optique. Nous avons vu que les peracides, par leur structure chélatée étaient particulièrement réactifs vis-à-vis des doubles liaisons éthyléniques (époxydation des oléfines), la réaction se faisant par un mécanisme de push pull (BLUM 1959) p. 66. Il nous paraît donc probable que le peracide réagisse de même sur les doubles

liaisons des hétérocycles des bases.

. En second lieu, les oxydants étant électrophiles, les sites privilégiés pour leur action seront les atomes les plus riches en électrons (ou les plus basiques au sens de LEWIS). D'après PULLMANN (1961) les doubles liaisons 5,6 des pyrimidines sont les plus riches en électrons, les carbones les plus négatifs étant C5 de la cytosine et C8 de la guanine. Les azotes les plus basiques étant N 7 de la guanine et N 1 de l'adénine. On constate que ce sont aussi les sites privilégiés d'action de différents agents oxydants. Ainsi les radiations ionisantes attaquent préférentiellement les liaisons 5-6 des pyrimidines pour former des hydroxyhydroperoxydes (EKERT et MONIER 1959 et 1960) et les carbones 8 des purines pour former les 8 hydroxy-purines et les formamidopyrimidines correspondantes (HEMS 1958 et 1960, PONNAMPERUMA 1962). Les halogènes s'additionnent sur le carbone 5 des pyrimidines et le carbone 8 de la guanine (LONDOS 1965 et DUVAL, 1967) et l'acide nitrique provoque la nitration en C5 d'un dérivé de l'uridine (MICHELSON 1963 p. 27).

En troisième lieu, connaissant les sites les plus réactifs de la molécule, il est intéressant de pouvoir prévoir dans quelle mesure un substituant porté par l'atome voisin agira sur sa réactivité. SWERN (1947) a trouvé une règle régissant l'époxydation des oléfines : "Tous les groupements susceptibles de diminuer le pouvoir nucléophile de la double liaison (c'est-à-dire de l'appauvrir en électrons) ralentissent la vitesse d'époxydation des oléfines".

Cette règle nous paraît généralisable à l'action de l'acide persuccinique sur les bases du DNA. Nous avons en effet constaté qu'à pH 7 : l'adénine, la cytosine et la 5 méthyl-cytosine sont beaucoup plus dégradées que l'hypoxanthine, l'uracile et la thymine respectivement. Les seules différences entre ces

deux classes étant que la deuxième possède un groupement carbonyle (Fig.3) qui appauvrit considérablement plus les atomes voisins (N1 et C5) en électrons que ne le fait le groupement aminé (JULIA 1959). Il en est de même pour la formation des 1-N-oxydes. Nous avons mis en évidence la formation de fortes proportions de 1-N-oxydes (60 à 95%) sur l'adénine, la cytosine et l'acide déoxyadénylique. STEVENS et Coll. (1958 a et b, 1959) ont préparé les 1-N-oxydes de l'adénine, de l'adénosine et des différents acides adényliques en faisant réagir l'acide peracétique (en milieu acide) sur ces composés. Mme CHEVALLIER (1964) a obtenu les 1-N-oxydes de AdR, CdR, dAMP et dCMP en traitant ces composés par l'acide persuccinique. Enfin CRAMER, RANDERATH et SCHÄFER (1963) ont transformé l'ADP en ADP-1-N oxyde par traitement avec l'acide perphtalique à pH 7, CRAMER et SEIDEL (1963) ont transformé de même la cytosine, CdR et CMP en 1-N-oxydes, ils n'ont, par contre, pas observé la 1-N-oxydation de la guanine, de l'uracile et de la thymine. La cause de ces résultats négatifs semble très claire : c'est l'appauvrissement de l'azote 1 en électrons, dû à l'effet inductif très fort des groupements carbonyles voisins. Dans l'adénine, la cytosine et leurs dérivés, par contre, la présence du groupement aminé voisin est beaucoup plus favorable à la constitution du doublet sur l'azote 1 et donc à la formation d'une liaison semi polaire avec un oxygène.

A côté de l'effet inductif des substituants, il convient aussi de considérer leur effet stérique, il semble en effet que ce soit à l'encombrement des groupes méthyle , gênant l'approche de l'acide persuccinique que sont dues les accroissements de résistance à la dégradation quand on passe de la cytosine à la thymine et de l'uracile à la 5 Méthylcytosine, l'effet inductif du groupe méthyle, d'ailleurs très faible, devant agir plutôt en sens inverse. On pourrait de la même façon expliquer la résistance, généralement plus grande des purines : le cycle imidazole gênant l'action de l'acide persuccinique sur la liaison 4-5.

Dans la mesure où des facteurs stériques interviennent, nous pouvons nous attendre à ce que les sensibilités des bases vis à vis du peracide soient modifiées lorsque celles-ci sont liées au déoxyribose, au déoxyribose-phosphate et surtout intégrées au DNA.

En ce qui concerne l'action sur les cycles des bases dans les nucléotides, rappelons que nous avons trouvé que l'acide déoxycytidylique est 5 fois moins sensible au peracide que la cytosine tandis que l'acide déoxyguanylique l'est 5 fois plus que la guanine. Pour expliquer cette différence par des facteurs stériques il faut admettre que la conformation de l'acide déoxyguanylique est beaucoup plus favorable à une association avec l'acide persuccinique que ne l'est la conformation de l'acide déoxycytidylique. Les résultats cristallographiques, obtenus par AEV HASCHEMEYER (à paraître) étayent cette hypothèse: la guanosine et GMP semblent avoir, au moins à l'état cristallin, une conformation très différente de celle des autres ribonucléosides et ribonucléotides.

Il convient aussi de considérer que le déoxyribose et le déoxyribose-phosphate n'interviennent pas seulement par leur encombrement, ils ont aussi un effet inductif sur la base à laquelle ils sont attachés : ils l'appauvrissent en électrons, cet effet, mesurable par la baisse des pKa doit aussi se traduire globalement par une baisse de sensibilité aux agents oxydants.

Rappelons pour terminer, que dans les conditions utilisées où la destruction des cycles puriques et pyrimidiques des nucléotides est de 60 à 80%, nous n'avons pas détecté la formation de bases ni de nucléosides libres. Il semble donc que l'acide persuccinique n'agisse que sur les cycles des bases et en particulier qu'il ne détruise pas le sucre. Nous verrons qu'il n'en est pas de même dans l'action de l'eau oxygénée.

Il nous semble, pour conclure, qu'un aspect intéressant des résultats obtenus dans l'action de l'acide persuccinique sur les bases et les nucléotides est qu'ils étayent les conceptions générales que l'on a sur les sites réactifs des dérivés du DNA et sur l'influence des différents substituants.

Nous avons vu que les groupes aminés de l'adénine,de la cytosine et de la 5 Méthylcytosine, étant moins électrophiles que les carbonyles, facilitent, d'une part la formation de 1-N-oxydes et d'autre part la destruction de la molécule.

En ce qui concerne les liaisons C4-C5, sites privilégiés d'action de différents agents oxydants, nous pensons que l'acide persuccinique agit vraisemblablement dans une première étape pour former un époxyde, cet époxyde doit ensuite s'hydrolyser en glycol ou provoquer la rupture du cycle. Nous n'avons pas mis en évidence ces composés par les méthodes utilisées, ceux-ci n'absorbant pas dans l'U.V. Nous n'avons pas non plus mis en évidence de peroxydes sur les chromatogrammes des bases traitées par le peracide, il ne semble donc pas qu'il se forme des hydroperoxydes sur les pyrimidines comme lors de l'action des radiations ionisantes (EKERT et MONIER 1959 et 1960).

Nous avons vu que l'augmentation de résistance constatée quand on passe de la cytosine et de l'uracile à la thymine et à la 5 Méthylcytosine puis aux purines peut s'expliquer par l'encombrement du groupe méthyle et du cycle imidazole qui gènent l'approche de la liaison C4-C5 par le peracide.

L'explication des différences relatives de réactivités constatées entre les bases et les nucléotides nécessite une étude plus poussée des mécanismes de réaction liés aux conformations des nucléotides.

Le fait que l'acide persuccinique agisse sélectivement sur les cycles des bases et apparemment pas sur le déoxyribose distingue cet oxydant de l'eau oxygénée. Cette différence doit se traduire notamment dans les modes d'action de ces deux agents sur le DNA.

II - Action de l'acide persuccinique sur le DNA

1) Modification de sa composition chimique

A - Etude par hydrolyse formique et chromatographie sur papier

La méthode générale d'étude mise au point consiste à faire agir l'acide persuccinique sur le DNA en solution aqueuse tamponée à pH 7 par du succinate de sodium 0,1 molaire. On laisse agir pendant environ 30 heures à 37° (temps nécessaire à l'inactivation complète du peracide).

La principale difficulté consistait à maintenir le pH à peu près constant pendant l'action du peracide. Nous avons vu en effet que l'acide succinique, produit de la décomposition du peracide, est plus ionisé, donc plus acide que ce dernier, le pH tend donc à baisser au cours du temps ; nous l'avons rétabli à pH 7 par des additions de petites quantités de soude au cours de la réaction. La solution de DNA traitée est ensuite dialysée jusqu'à l'équilibre contre du succinate de sodium 0,1 molaire en vue de récupérer d'éventuels produits de dégradation dialysables ; elle est ensuite dialysée plusieurs fois contre de l'eau distillée pour éliminer le succinate de sodium plus lyophilisée. Le DNA ainsi obtenu est analysé par hydrolyse formique suivie de chromatographie bidimensionnelle sur papier, comme il a été indiqué au chapitre I. Cette technique permet de déterminer la quantité de bases présentes dans le DNA par atome de phosphore. Par comparaison avec un échantillon de DNA non traité, on déduit la fraction des bases qui ne sont plus détectables par cette méthode, soit qu'elles aient été détachées de la molécule de DNA et éliminées au cours de la dialyse, soit que leurs hétérocycles, modifiés par l'action du peracide aient perdu toute absorption dans l'ultra-violet ou n'aient pas résisté à l'hydrolyse formique.

Résultats expérimentaux

Après traitement du DNA natif par l'acide persuccinique, on constate une diminution de la quantité de bases détectables par rapport au phosphore qui croît avec la concentration en peracide (Tableau VII A), et le pH du milieu réactionnel (comparer les colonnes (3) des tableaux VII et VIII). La quantité de bases non détectables par cette méthode est beaucoup plus importante lorsque l'on traite par le peracide du DNA préalablement dénaturé, soit par la chaleur (Tableau VIII), soit par alcalinisation (Tableau IX). Par ailleurs la sensibilité des bases dans le DNA croit dans l'ordre $T < A = C < G$ dans tous les cas.

En plus des quatre bases du DNA, on voit apparaître trois bases nouvelles dont deux ont pu être identifiées : ce sont, d'après leurs spectres à pH 1 et à pH 12 et leurs Rf dans les deux solvants utilisés, de l'hypoxanthine et de l'uracile. La troisième, notée A_3, n'a pas été identifiée, mais ses spectres à pH acide et alcalin présentent une certaine ressemblance avec ceux de l'adénine 1-N-oxyde, la principale différence étant un déplacement de l'ensemble des spectres d'environ 10 mμ vers les courtes longueurs d'onde.

La fraction de produits de dégradation du DNA, dialysables et absorbant dans l'ultraviolet est faible (de 1 à 7%) par rapport à la fraction de bases dégradées (de 30 à 50%). Il y a donc relativement peu de liaisons déoxyribose-base (ou déoxyribose-phosphate) rompues. Dans l'action de l'eau oxygénée, par contre, la fraction de produits dialysables absorbent dans l'ultra-violet est plus importante pour un taux moindre de dégradation des bases (cf. Chapitre III).

Tableau VII

Action de l'acide persuccinique sur le DNA natif

A - Résultats de l'analyse chromatographique

N° de l'échantillon	(1)	(2)	(3)	(4)
Conc. en Peroxyde mg/ml	0	10	20	40
Guanine	100	79	70,5	68
Adénine	100	87	79	72
Hypoxanthine	-	-	3,5	4
Cytosine	100	91,5	85,5	75
Uracile	-	-	-	-
Thymine	100	95	91	91,5
Bases du DNA (moyenne)	100	88,5	82	77
Bases nouvelles (moyenne)	-	-	1	1

B - Résultat des Mesures Physiques

Tm.	85°	83°	83,7°	80,5°
Effet hyperchromique à 100°	43 %	38 %	34,3 %	36,8 %
Diffusion Centrale des RX				
Rc	9	9	8,5	8,5
M (è/Å)	105	103,5	93,25	94

Le DNA (PFI 1) à la concentration de 1 mg/ml a été traité par du peroxyde de disuccinoyle (conc. variant de 10 à 40 mg) dans du tampon succinate 0,1 M à pH 6. Les solutions ont été maintenues pendant 25 heures à 37° à l'obscurité. La récupération des bases par rapport au phosphore a été évaluée, ici comme dans les tableaux VIII et IX, par comparaison avec un échantillon non traité pris comme référence.

Tm : Température de transition du DNA en ClNa 0,15 M

Rc : Rayon de giration du bâtonnet de DNA par rapport à son axe

M : Sa masse par unité de longueur en électrons par A.

Tableau VIII

Action de l'acide persuccinique sur le DNA natif et le DNA dénaturé par la chaleur

	DNA non dénaturé				DNA dénaturé	
N° de l'échantillon	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Conc. en Peroxyde mg/ml	0	10	20	40	10	20
Guanine	100		61		63	39,5
Adénine	100		65		63	40
Hypoxanthine	-		8,5		9	19
A_3	-		2,5		3	5,5
Cytosine	100		64		62	43
Uracile	-		4		3,5	10
Thymine	-		77		91	79
Bases du DNA (moyenne)	100		68		70,5	51
Bases nouvelles (Moy.)	-		4		4	9
$10^{-6}\ \overline{M}_w$	4,8	3,1	1,4	0,8	-	0,10
$\sqrt{\overline{s^2}}$ (Å)	2600	1420	1340	1100	-	500

Une partie du DNA (V 202) à la concentration de 1 mg/ml a d'abord été dénaturée par chauffage pendant 15 minutes à 100° dans du succinate de sodium 10^{-3} M suivi d'un refroidissement brusque dans la glace fondante. Il a ensuite été traité, de même que le DNA non dénaturé, par du peroxyde de disuccinoyle à différentes concentrations comprises entre 10 et 40 mg par ml. Le pH du milieu réactionnel a été maintenu entre 6,2 et 7,2 par du tampon succinate 0,25 M. Les solutions ont été maintenues pendant 24 heures à 37° à l'obscurité.

Tableau IX

Action de l'acide persuccinique sur le DNA dénaturé par alcalinisation

Conc. en peroxyde (mg/ml)	0	2	5	15	30
Guanine	100	95	70	49	10
Adénine	100	95	78	54	20
Hypoxanthine	-	-	6	14	27
A_3	-	-	2	6	12
Cytosine	100	100	83	53	22
Uracile	-	-	-	4	17
Thymine	100	99	89	58	40
Bases du DNA (moyenne)	100	97	80,5	54	24
Bases nouvelles (moyenne)	-	-	2	6,5	14,5

Les DNA (PFI 1) à la concentration de 1 mg/ml a été traité par du peroxyde de disuccinoyle (conc. variant de 2 à 30 mg par ml) dans du tampon succinate 0,25 M à pH 7. Les solutions ont été maintenues pendant 24 heures à 37° et à l'obscurité. Pendant la première minute d'action du peroxyde le pH du milieu a été élevé à 12 par addition de soude.

DISCUSSION.

Nous n'avons pas trouvé d'adénine 1-N-oxyde (ni de Cytosine 1-N-oxyde) dans les hydrolysats formiques de DNA traité, alors que ces composés ont été détectés lors de la peroxydation des bases et des nucléotides (voir § I - 2, STEVENS et BROWN(1958), CRAMER et SEIDEL (1963 a et b et 1964), M.R.CHEVALLIER(1964). Par contre nous avons trouvé de petites quantités d'uracile et d'hypoxanthine. Ces deux composés pourraient provenir de la déamination directe par le peracide de la cytosine et de l'adénine ou bien de l'action de l'hydrolyse formique sur un produit d'oxydation des bases du DNA (Cytosine 1-N-oxyde et Adénine 1-N-oxyde par exemple). La première hypothèse semble exclue, nous n'avons en effet jamais obtenu directement de l'hypoxanthine en faisant agir l'acide persuccinique sur l'adénine. Par contre, de l'adénine 1-N oxyde soumise à l'hydrolyse formique (une heure à 175°) a donné un mélange de trois composés séparables par chromatographie sur papier avec comme solvant le mélange Butanol/Ethanol/Eau :4/1/1. (DUNN, MAGUIRE et BROWN 1959). Leurs spectres à pH 0 et 14 et leurs Rf (0,26 - 0,35 et 0,43) ont permi de montrer que ces trois composés correspondent respectivement à l'adénine 1-N-oxyde, à l'hypoxanthine et à l'adénine, leurs proportions respectives étant 37%, 17% et 46%. Il est possible qu'en outre une partie de l'adénine 1-N-oxyde soit dégradée sous forme de produits qui n'absorbent plus dans l'ultraviolet. Remarquons qu'une fraction importante d'adénine 1-N-oxyde réverse à l'état d'adénine.

Ces résultats conduisent à penser qu'une certaine quantité d'adénine 1-N-oxyde pourrait se former sur le DNA lors de l'action de l'acide persuccinique, de même que d'autre produits d'oxydation labiles qui sont détruits ou transformés par l'hydrolyse formique. Nous avons donc essayé de détecter ces produits en utilisant une méthode d'hydrolyse plus douce.

Figure 8a

Séparation chromatographique sur résine Dowex de l'hydrolysat d'un DNA natif de thymus de veau

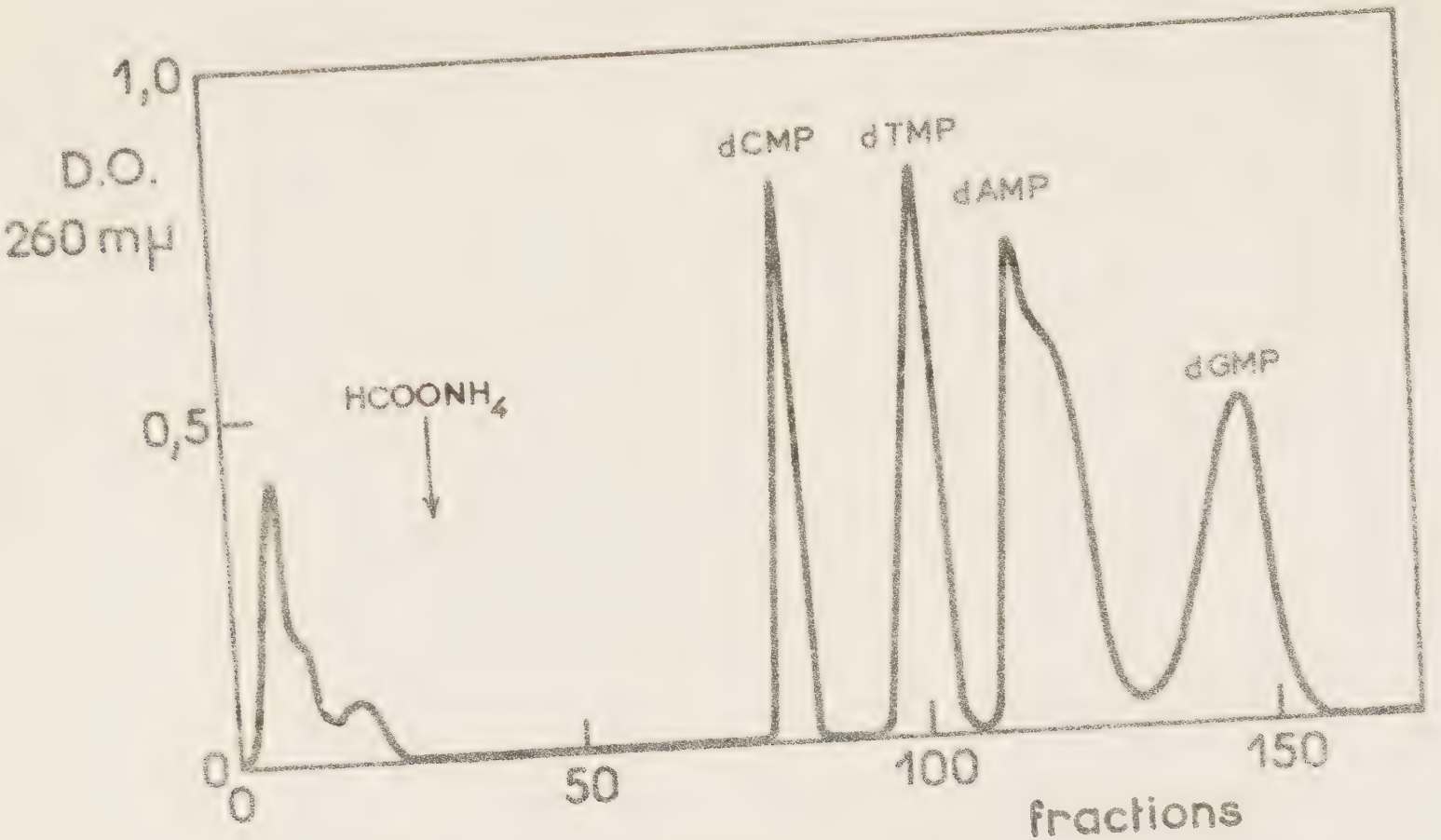
Conditions expérimentales : voir chap. I § II 3/B

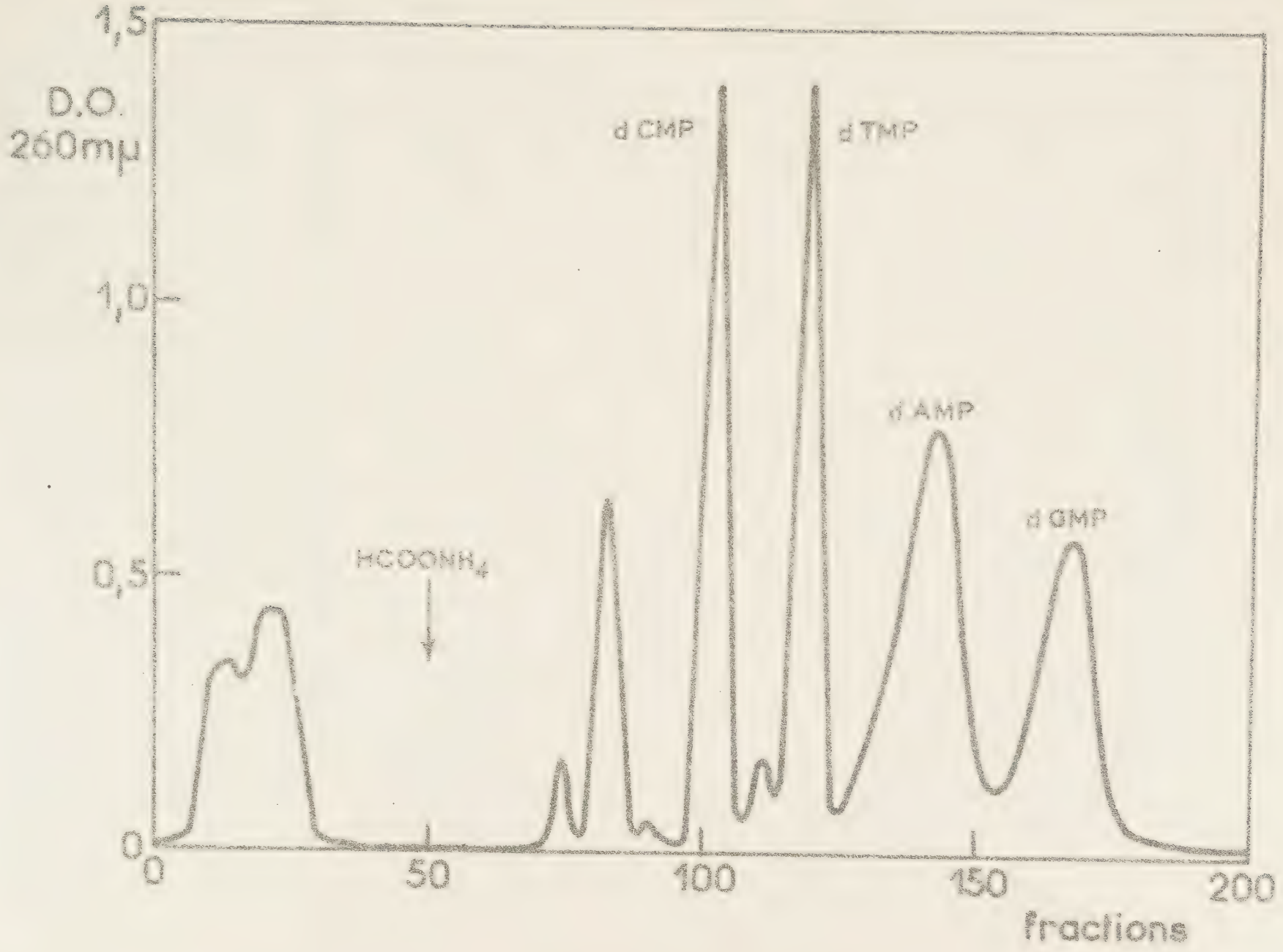
En plus des quatre déoxyribonucléotides 5', il y a séparation des déoxyribonucléosides produits par l'action de traces de 5' nucléotidase contenue dans la phosphodiesterase préparée. Ces nucléosides s'éluent par rinçage de la colonne avec de l'eau.

Figure 8b

Séparation chromatographique sur résine Dowex de l'hydrolysat d'un DNA de thymus de veau traité par l'acide persuccinique

En plus des quatre déoxyribonucléotides 5' et des nucléosides, on voit apparaître quatre composés nouveaux.


1,0
D.O.
260 mμ
0,5
0
0
50
100
150
fractions
HCOONH4
dCMP
dTMP
dAMP
dGMP


1,5
D.O.
260mμ
1,0
0,5
0
0
50
100
150
200
fractions
d CMP
d TMP
d AMP
d GMP
HCOONH4

B - Etude par hydrolyse enzymatique et chromatographie sur colonne

Les résultats obtenus par cette méthode se sont malheureusement avérés complexes et n'ont pas permis de préciser plus avant les résultats précédents. Cinq composés nucléotidiques nouveaux ont été mis en évidence (Fig. 8a et 8b) ; mais ni leur chromatographie sur papier dans différents solvants, ni leurs spectres à différents pH n'ont permis de les identifier de façon inéquivoque avec des composés connus. Signalons qu'une des difficultés majeures rencontrées pour l'indentification de ces produits par chromatographie sur papier venait probablement de l'hydrolyse, au cours de leur isolement, des nucléotides en nucléosides et bases dont les Rf sont très différents du nucléotide correspondant.

Dans nos conditions expérimentales, l'acide déoxyadénylique 1-N-oxyde s'élue de la colonne au même endroit que l'acide déoxycytidylique, nous l'avons donc recherché par chromatographie sur papier dans le pic d'élution de l'acide déoxycytidylique du DNA traité. Nous avons trouvé des quantités appréciables d'un composé très voisin de l'adénine et de l'adénine déoxyriboside, mais non pas d'acide déoxyadénylique 1-N-oxyde ni d'adénine 1-N-oxyde.

2) Modification des propriétés physico-chimiques du DNA par action de l'acide persuccinique

L'étude des effets de l'acide persuccinique sur la composition chimique du DNA et de ses constituants a montré que cet agent affecte essentiellement les bases du DNA ou des déoxyribonucléotides. Ces conclusions sont confirmées par l'étude des propriétés physico-chimiques du DNA, étudiées par diffusion de la lumière et des rayons X, ainsi que par l'étude des courbes de transition que nous allons détailler ci-dessous.

A – Etude par diffusion de la lumière

Cette étude a été faite sur trois échantillons de DNA de thymus de veau (PFI 1, PFI 2 et V 202). Le PFI 2 présentait une formation d'agrégats qui se dissociaient par chauffage pendant 10 minutes à 100°. Par contre, les échantillons PFI 1 et V 202 n'ont pas donné de formation apparente d'agrégats. L'échantillon PFI 1 a été traité en solution diluée par l'acide persuccinique (Tableau X) et le V 202 en solution concentrée (Tableau VIII). Les résultats sont tout-à-fait comparables. Dans le premier cas la masse moléculaire passe de 6 millions à 2 millions et l'analyse chimique indique que 30 % des bases ont été dégradées. Dans le deuxième cas, pour un même taux de dégradation des bases, la masse moléculaire est aussi réduite au tiers de sa valeur initiale (Tableau VIII, col. 3). Remarquons aussi que les résultas ne dépendent pas du tampon utilisé (Tableau X).

DISCUSSION

Le taux de "dépolymérisation" du DNA par l'acide persuccinique est très faible par rapport au taux de dégradation des bases. On peut en effet calculer à l'aide de la théorie qui sera développée au chapitre III que la diminution de la masse moléculaire de 6 millions à 2 millions correspond à la rupture d'une liaison phosphoester sur 2.400 ou sur 110 suivant que la dégradation se fait respectivement suivant un mécanisme de 1ère ou de 2ème espèce. Comme dans le même temps 30 % des bases du DNA sont dégradées, cela signifie qu'il y aurait respectivement entre 720 et 33 bases dégradées par liaison phosphoester rompue.

Même dans ce deuxième cas, le nombre de liaisons phosphates rompues est faible par rapport à celui des bases dégradées. Il est d'ailleurs fort probable que ces ruptures

Tableau X

Action de l'acide persuccinique sur le DNA natif en solution diluée.

Tampon à pH 7 utilisé	N° de la série analysée	Echantillons Témoins (DNA+ac. succinique) $\overline{M}_w \cdot 10^{-6}$	Echantillons traités (DNA+ac.persuccinique) $\overline{M}_w \cdot 10^{-6}$
Succinate	(1)	6,2	1,9
	(2)	6,9	1,9
Phosphate	(3)	5,9	2,1
	(4)	5,7	1,5

Les échantillons de DNA (PFI 1) à la concentration de 0,1 mg par ml ont été maintenus pendant 30 heures à 37° et à l'obscurité dans des tampons phosphate au succinate 0,1 M à pH 7 préalablement stérilisés, on a en plus ajouté quelques gouttes de chloroforme pour inhiber le développement des microorganismes. A la moitié de ces échantillons on a ajouté de l'acide persuccinique (4 mg/par ml), et dans l'autre moitié la quantité équivalente d'acide succinique.

soient causées non pas directement par le peracide, mais plutôt indirectement par l'eau oxygénée formée dont l'activité dépolymérisante est bien supérieure à celle du peracide (Voir chapitre III).

B - Diffusion centrale des rayons X (Tableau VII)B

Même lorsque le taux de dégradation des bases est de 23 %, le DNA garde à courte distance la structure d'un bâtonnet rigide, dont le rayon de giration par rapport à son axe de symétrie diminue très légèrement. La masse par unité de longueur diminue de 10 % seulement.

C - Etude des courbes de transition

Les courbes de transition ont été effectuées en ClNa 0,15 M après élimination de l'acide persuccinique par dialyse (voir chapitre I) ; elles montrent qu'il y a toujours une transition franche à une température bien déterminée, même pour les échantillons ayant le plus de bases dégradées (Fig. 9 et Tableau VII,B). On note cependant une légère diminution de la température de transition(de 2° à 4°) et une diminution plus sensible de l'effet hyperchromique maximum à 100° (de 5 % à 10 %) après action de l'acide persuccinique sur le DNA.

Le fait que la température de transition diminue peu et que les courbes aient des profils similaires semble indiquer que la structure secondaire du DNA est relativement peu modifiée, même lorsque une quantité appréciable de bases à été dégradée par le peracide.

Figure 9

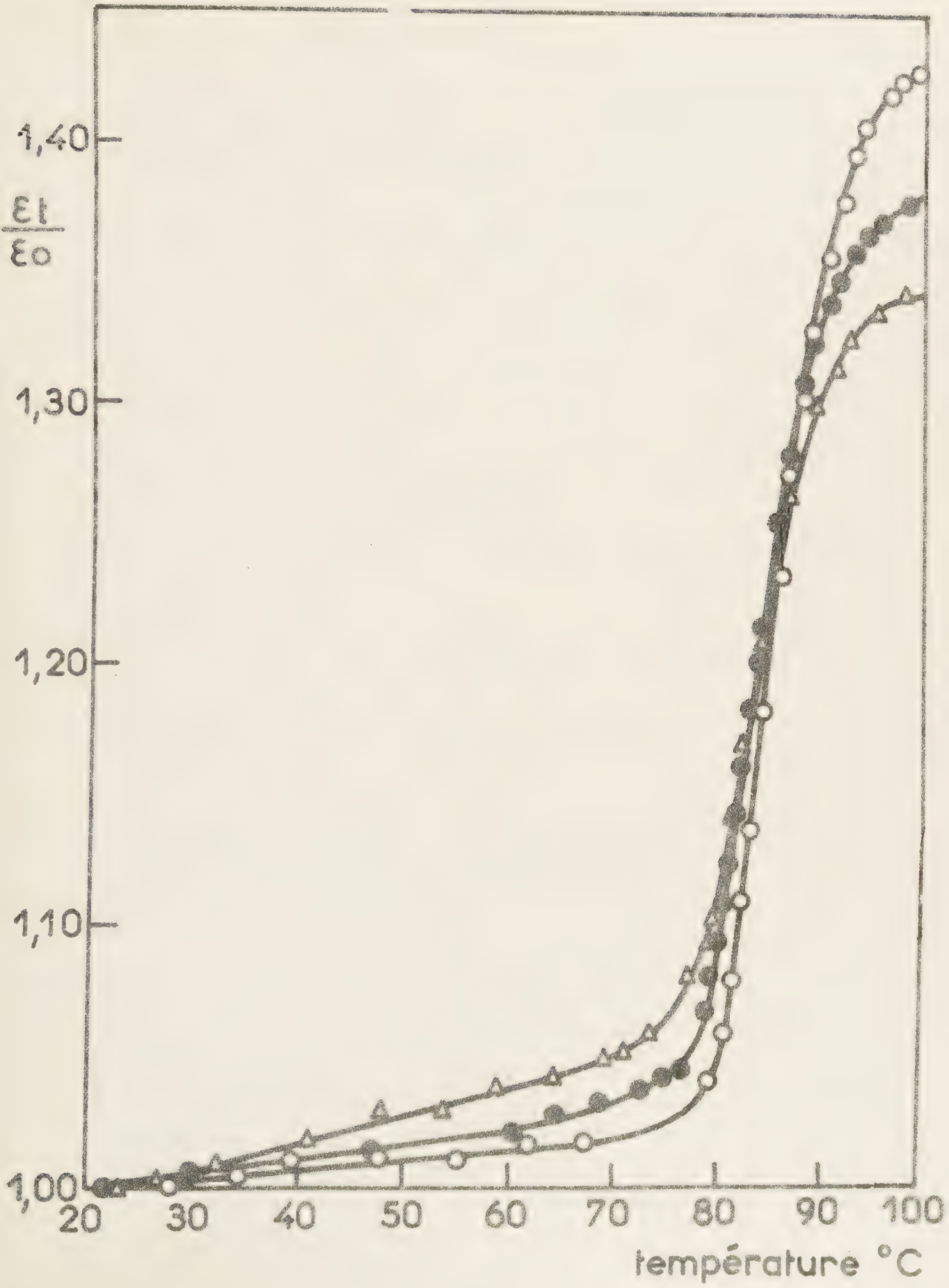
Courbes de transition d'un DNA traité par l'acide persuccinique

Les conditions expérimentales sont celles qui sont indiquées dans la légende du tableau VII. Les courbes de transition ont été effectuées en ClNa 0,15 M.

○ : DNA mis au contact de succinate de sodium

◍ : DNA mis au contact du peroxyde (10 mg par ml)

△ : DNA mis au contact du peroxyde (20 mg par ml)


1,40
ε1/ε0
1,30
1,20
1,10
1,00
20
30
40
50
60
70
80
90
100
température °C

D - Action de l'acide persuccinique sur la dénaturabilité du DNA par la chaleur

Nous venons de voir que la transition entre l'état natif et l'état dénaturé demeure très nette pour un DNA traité par l'acide persuccinique, même si le taux de dégradation des bases est assez élevé. Il est par conséquent intéressant de savoir si, à côté de son action dégradante sur les bases, l'acide persuccinique n'est pas capable de créer, entre les deux chaînes du DNA, des liaisons covalentes susceptibles de stabiliser sa structure secondaire comme le font l'acide nitreux et les agents alkylants difonctionnels (GEIDUSCHEK, 1961). En collaboration avec Mlle M.L. BACH, nous avons recherché cet effet au bout de 40 et 60 minutes d'action à 37° de l'acide persuccinique à la concentration de 6,7 mg par ml, lorsque son effet sur les bases n'est pas encore très sensible. Nous avons utilisé pour cette expérience du DNA de H. Influenzae à la concentration de 0,25 mg par ml. L'action de l'acide persuccinique est arrêtée par dilution au dizième dans du tampon succinate 0,2 M suivie de dialyse à 4° contre du chlorure de sodium citraté 0,3 M. La densité optique à 260 mμ et le pouvoir transformant des échantillons ont été mesurés avant et après dénaturation thermique, laquelle a été obtenue par chauffage pendant 10 minutes à 100° suivi d'un refroidissement rapide à 0°.

Les échantillons de DNA traités par le peracide sont plus résistants à la dénaturation thermique que ne le sont les échantillons de DNA non traités (Tableau XI). Cet effet s'observe aussi bien sur les propriétés optiques (9 % d'hyperchromicité résiduelle au lieu de 17 % pour le témoin) que sur les propriétés biologiques (38 % de pouvoir transformant initial au lieu de 2,6 % pour le témoin) (M.L. BACH, D. LUZZATI et M.R. CHEVALLIER 1966).

Tableau XI

Action de l'acide persuccinique sur la dénaturabilité du DNA par la chaleur

Temps de traitement à 37° par le peracide (minutes)		0	40	60
DNA non dénaturé (1)	DO_{260}	0,618	0,544	0,535
	Pouvoir transformant	100 %	29,8 %	22 %
DNA dénaturé par la chaleur et refroidi (2)	DO_{260}	0,721	0,614	0,583
	Pouvoir transformant	2,6 %	8,2 %	8,3 %
Effet hyperchromique résiduel	$\frac{(DO_{260})\ (2)}{(DO_{260})\ (1)}$	17 %	13 %	9 %
Fraction de l'activité transformante qui n'a pas été détruite par la dénaturation thermique	$\frac{(P.T.)\ (2)}{(P.T.)\ (1)}$	2,6 %	27,6 %	37,8 %

DISCUSSION

Nous avons vu au § I) 2 que la sensibilité des hétérocycles à l'acide persuccinique est grandement influencée par la présence du groupement déoxyribose-phosphate. On pouvait par conséquent s'attendre à ce que la structure organisée du DNA ait, elle aussi, une influence sur cette sensibilité. En fait, les bases sont plus sensibles à l'acide persuccinique lorsqu'elles sont intégrées dans la structure lâche du DNA dénaturé que lorsqu'elles sont intégrées dans la structure plus rigide du DNA natif. Ce résultat concorde avec ceux de CRAMER et SEIDEL (1963 et 1964) qui constatent que la 1-N-oxydation de l'adénine par l'acide peracétique ou perphtalique est d'autant plus difficile que la base est intégrée dans une structure macromoléculaire plus ordonnée : ainsi le poly A s'oxyde plus facilement que le poly (A + U), de même le RNA s'oxyde plus facilement que le DNA dénaturé. Quant au DNA natif, il est résistant à la 1-N-oxydation(CRAMER, communication personnelle).

Nous avons vu par ailleurs que le DNA natif est plus sensible à pH 7 qu'à pH 6 à l'action de l'acide persuccinique. Cette différence doit probablement être attribuée à l'instabilité du peracide laquelle croît avec le pH, plutôt qu'au DNA, étant donné qu'il ne change pas d'état entre ces deux pH.

Nous n'avons pas trouvé de dérivés N-oxydés dans le DNA traité par le peracide alors que nous en avons obtenu de grandes quantités par traitement de l'adénine, de la cytosine et de l'acide déoxyadénylique. Ce fait s'explique assez bien par les raisons suivantes :

1) La structure secondaire rigide du DNA rend les azotes 1 inaccessibles à l'acide persuccinique, en particulier parce que ceux-ci sont engagés dans des ponts hydrogène. Ce sont d'ailleurs les conclusions auxquelles arrivent CRAMER et

SEIDEL (1963c, 1963d, 1964) et SEIDEL (1966).

2) L'adénine 1-N-oxyde qui a pu quand même se former (en particulier dans le DNA dénaturé) a pu être transformée en adénine et en hypoxanthine par l'hydrolyse formique comme nous l'avons vu plus haut. Ceci expliquerait l'origine de l'hypoxanthine trouvée dans les hydrolysats formiques des DNA traités. Il est vraisemblable que l'uracile en moindre quantité a une origine parallèle, c'est-à-dire qu'il proviendrait de la cytosine 1-N-oxyde formée dans le DNA.

Il y a donc tout lieu de penser que l'hypoxanthine et l'uracile proviennent respectivement de l'adénine et de la cytosine, que ce soit par une déamination directe (comme par l'action de l'action nitreux) ou par l'intermédiaire de produits oxydés comme les 1-N-oxydes par exemple.

La diminution relativement faible de la masse moléculaire du DNA, de même que la faible production de substances dialysables absorbant aux U.V., indiquent que les liaisons phosphoester et déoxyribose-base sont assez peu touchées par l'action de l'acide persuccinique quand les bases le sont déjà considérablement. Ces observations sont en bon accord avec les résultats obtenus lors de l'étude de l'action de l'acide persuccinique sur les nucléotides.

Il est remarquable que la structure secondaire du DNA, étudiée par diffusion centrale des rayons X et par ses courbes de transition, soit relativement peu modifiée par un taux de dégradation des bases allant jusqu'à 23 %. Pour un taux de dégradation de 30 %, un dosage d'azote et du phosphore présent dans le DNA après dialyse montre que 92 % de l'azote est resté lié à la molécule. Il semble donc que l'acide persuccinique modifie les bases du DNA in situ, sans les détacher de façon appréciable, et que ces modifications,

quoiqu'importantes au niveau des bases ne sont pas suffisantes à l'échelle de la molécule pour provoquer la disloquation de la structure en double hélice.

Il est d'ailleurs possible que le peracide ait lui-même une action stabilisante sur cette structure, au moins au début de son action, par la formation de ponts covalents entre les deux chaînes, comme semble l'indiquer l'augmentation de la résistance du DNA à la dénaturation après l'action peu prolongée du peracide.

CHAPITRE III

ACTION DE L'EAU OXYGENEE SUR LE DNA ET SES CONSTITUANTS

L'eau oxygénée (H_2O_2) se forme spontanément par hydrolyse des peracides en solution aqueuse. On en trouve toujours dans les milieux aqueux (biologiques en particulier) soumis aux radiations ionisantes. Pour ces raisons il était intéressant d'étudier son action sur le DNA et ses constituants.

La décomposition de l'eau oxygénée, beaucoup plus lente que celle de l'acide persuccinique, se fait suivant des modalités différentes et très complexes, elle est en particulier grandement influencée par la lumière et les ions de métaux de transition.

Après avoir examiné quelques caractéristiques de la décomposition de l'eau oxygénée, nous étudierons, comme dans le cas de l'acide persuccinique, son action sur les bases du DNA, les nucléotides et le DNA*.

Nous verrons que son action sur les cycles des bases est beaucoup plus lent et qualitativement différent de celle de l'acide persuccinique. Son action sur les liaisons déoxyribose-base et déoxyribose-phosphate est par contre importante dans des conditions appropriées.

En ce qui concerne la cinétique de dégradation du DNA, il est apparu que certains facteurs ont une action déterminante et très nette sur le cours de la dégradation par H_2O_2 (traces d'ions de métaux de transition, lumière). L'influence des ions de métaux de transition est particulièrement

---

* Cette étude a fait l'objet de deux publications : H. SCHWEITZ et D. LUZZATI (1963) et H. SCHWEITZ (1967).

intéressante à étudier étant donné leurs différents modes de fixation sur le DNA, lesquels ont déjà fait l'objet de nombreuses études. Des ions métalliques fixés sur le DNA pourraient en particulier focaliser l'action de H_2O_2 en certains sites privilégiés de la molécule. Nous interprèterons nos résultats à l'aide d'une théorie que nous avons été amené à développer et qui rend par ailleurs compte de différents types de cinétique observés lors de la dégradation du DNA par d'autres agents tels que la DNAse acide et les Ultra-sons.

I - Etude de la décomposition de l'eau oxygénée et des facteurs qui régissent cette décomposition

Il existe une bibliographie abondante concernant les modes de décomposition de l'eau oxygénée, mais rien n'a jamais été écrit de définitif ni d'exhaustif tant les mécanismes sont complexes. Les modes de décomposition les plus étudiés sont la décomposition photochimique et surtout la décomposition catalysée par les ions de métaux de transition et de métaux lourds.

Nous passerons rapidement en revue les principaux travaux qui ont trait à la décomposition de l'eau oxygénée en milieu homogène, à pH voisin de la neutralité et à la température ordinaire, lorsque cette décomposition est induite par la lumière ou catalysée par les ions ferreux, ferriques ou cuivriques.

En 1934 HABER et WEISS ont proposé pour la décomposition de l'eau oxygénée en présence d'ions ferreux la réaction d'initiation suivante :

$$H_2O_2 + Fe^{++} \longrightarrow HO^\circ + OH^- + Fe^{+++} \quad \Delta G = + 20 \text{ Kcal} \quad (1)$$

Il est intéressant de noter que le mélange H_2O_2 + Fe^{++}, connu sous le nom de réactif de FENTON, est utilisé en chimie organique pour son grand pouvoir oxydant.

En présence d'ions Fe^{+++}, HABER et WEISS ont proposé la réaction d'initiation suivante :

$$H_2O_2 + Fe^{+++} \longrightarrow HO_2^{\bullet} + H^+ + Fe^{++}, \quad \Delta G = + 30 \text{ Kcal} \quad (2)$$

En 1952 URI propose une modification de (1) :

$$H_2O_2 + Fe^{++} \longrightarrow HO^{\bullet} + [Fe^{+++}\ OH^-], \quad \Delta G = + 6 \text{ Kcal} \quad (1')$$

(1') contrairement à (1) se ferait sans variation d'entropie grâce à la formation du complexe $[Fe^{+++}\ OH^-]$. La conséquence en est que l'énergie libre nécessaire à la réaction n'est que de 6 Kcal avec les ions Fe^{++} au lieu de 30 Kcal avec les ions Fe^{+++}. Ces résultats expliqueraient pourquoi la décomposition de H_2O_2 est beaucoup plus rapide en présence d'ions Fe^{++} qu'en présence d'ions Fe^{+++}.

En présence de l'un ou l'autre ion, les réactions de propagation et de terminaison de la chaîne de décomposition mènent aux radicaux $HO^{\bullet}$ et $HO_2^{\bullet}$ et à l'oxygène moléculaire, mais leur importance diminue vis-à-vis des réactions d'initiation lorsqu'il y a dans la solution un substrat oxydable susceptible de capter les radicaux libres dès leur formation.

En résumé on peut dire qu'en présence d'ions ferreux et ferriques, l'eau oxygénée donne naissance aux radicaux $HO^{\bullet}$ très réactifs et aux radicaux $HO_2^{\bullet}$ qui le sont sensiblement moins, (CROUZET 1966), les premiers étant produits de préférence par les ions ferreux et les seconds par les ions ferriques.

D'après SHPITALSKII et coll. (1931), BARB et coll. (1951) l'ion cuivrique libre et seul est peu actif dans la décomposition de l'eau oxygénée, mais il a un grand effet promoteur en activant la décomposition catalysée par les ions ferriques et ferreux.

La décomposition photochimique de l'eau oxygénée a été étudiée en particulier par SCHUMB et coll. (1955), SYMONS (1960) et PASCAL (1960). Il paraît établi que la réaction d'initiation de la décomposition :

$$H_2O_2 + h\nu \longrightarrow HO^\bullet + HO^\bullet$$

ne se produit qu'avec des radiations de longueur d'onde inférieure à 3.800 Å (ce qui correspond à une énergie d'activation d'environ 75 Kcal/mole). Dans les solutions d'eau oxygénée de concentration inférieure à 0,2 molaire, et pour une intensité d'éclairement modérée (inférieure à 10^{17} quanta par litre, par seconde), la vitesse de décomposition de l'eau oxygénée est proportionnelle à sa concentration et à la racine carrée de l'intensité lumineuse. Pour des intensités lumineuses très faibles, la vitesse de décomposition est indépendante de l'intensité lumineuse (PASCAL 1960) (SCHUMB et coll. 1955).

Les radicaux $HO^\bullet$ donnent naissance à quelques radicaux $HO_2^\bullet$ en agissant sur H_2O_2 ; par conséquent, comme dans le cas de la décomposition catalysée par les ions métalliques, les espèces actives obtenues sont les radicaux libres $HO^\bullet$ et $HO_2^\bullet$. La réactivité des radicaux $HO^\bullet$ est équivalente à celle du chlore atomique, elle n'est dépassée que par celles du fluor atomique et du radical $ClO_4^\bullet$. Les radicaux $HO^\bullet$ et $HO_2^\bullet$ se forment toujours par l'action des radiations ionisantes sur les solutions aqueuses aérées, d'où l'intérêt de l'étude de leur action sur des produits d'origine biologique.

Le mode d'action le plus général de ces radicaux sur les composés organiques est du type :

$$HO^{\bullet} + R\text{-}H \longrightarrow R^{\bullet} + H_2O$$

Le radical $R^{\bullet}$ peut à son tour évoluer, en particulier en fixant une molécule d'oxygène lorsqu'on opère en milieu aéré.

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

le radical peroxyde est instable, il évoluera à son tour entraînant une dégradation plus ou moins poussée de la molécule initiale RH.

Etude expérimentale de l'influence de quelques facteurs sur la décomposition de H_2O_2

Nous avons suivi la décomposition de H_2O_2 en déterminant par iodométrie la diminution de sa concentration en fonction du temps dans des solutions aqueuses tamponnées ((Phosphate de sodium ou Potassium 0,1 M ou 0,3 M à pH 7).

a) Influence des ions Fer

L'eau oxygénée se décompose beaucoup plus lentement dans un tampon phosphate préparé à partir des produits Merck que dans un tampon préparé à partir des produits Prolabo (Fig. 10). Dans ce dernier tampon, nous avons détecté, par dosage colorimétrique avec le sulfocyanure, environ 6.10^{-5} atome gramme de fer par litre (Fe^{+++} vraisemblablement), alors que nous n'avons détecté que des traces indosables de fer dans le premier. Par addition supplémentaire de Fe^{+++} (2.10^{-4} M) dans le 2e tampon on augmente encore la vitesse de décomposition de H_2O_2 (20 % en 70 heures à 37° et à l'obscurité au lieu de 10 %).

Figure 10

Décomposition de H_2O_2 en fonction du temps, en présence et en absence de DNA et d'ion Fer

	H_2O_2	DNA	Tampon Phosphate (pH 7)	Ion Fer
●	2.10^{-2} M	6.10^{-4} M	Merck 0,1 M	traces
○	"	0	" "	"
▨	"	6.10^{-4} M	Prolabo 0,3 M	6.10^{-5} M
□	"	0	" "	"

Les solutions sont exposées à la lumière du jour et maintenues à 25°C.

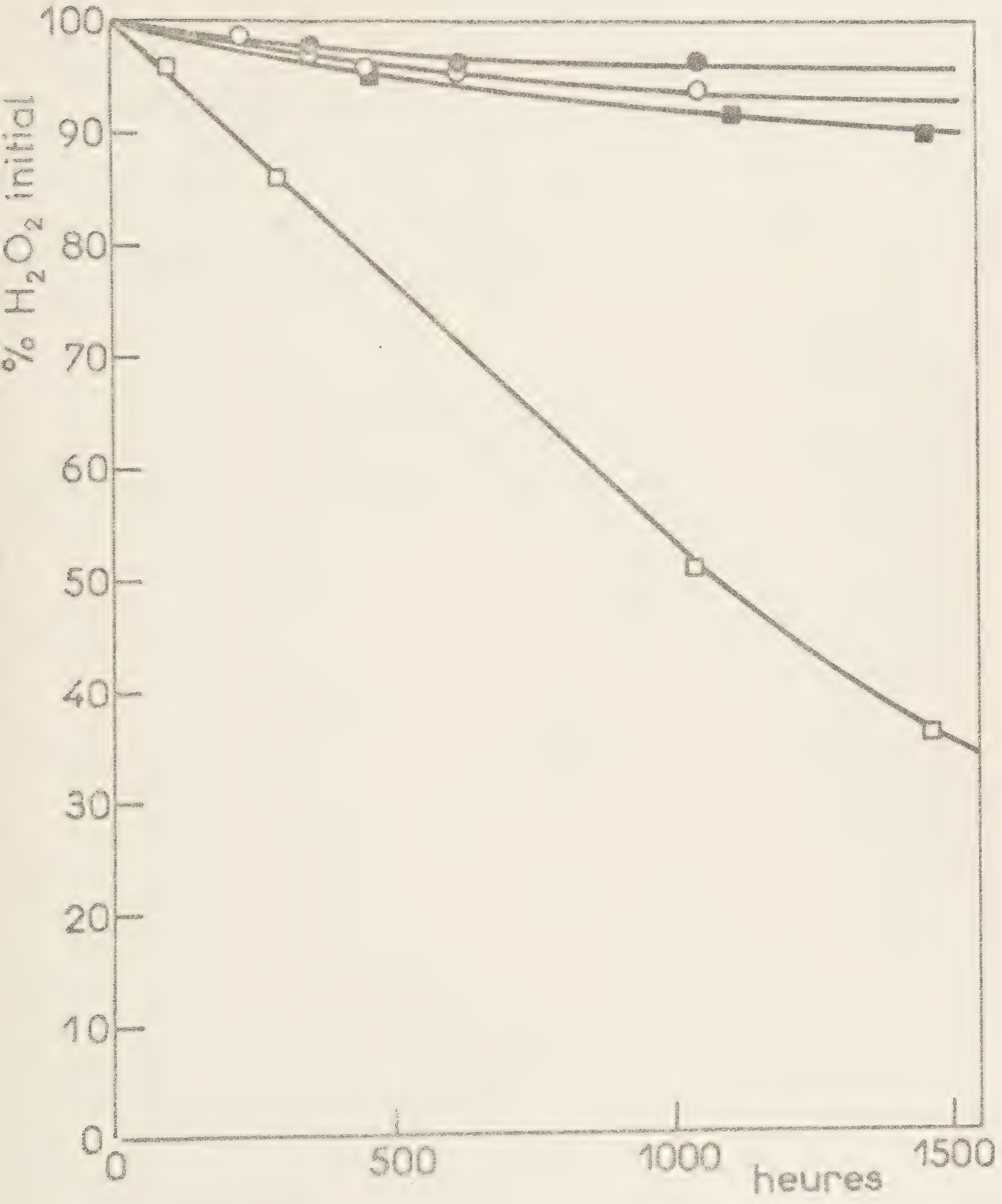

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% H_2O_2 initial
0
500
1000
1500
heures

Figure 11

Décomposition de H_2O_2 en fonction du temps en présence des déoxyribonucléotides

H_2O_2 : $0,42.10^{-2}$ M

Déoxyribonucléotides : 8.10^{-5} M

Tampon phosphate (Prolabo) à pH 7 : 0,1 M

Les solutions sont maintenues à 37° à l'obscurité.

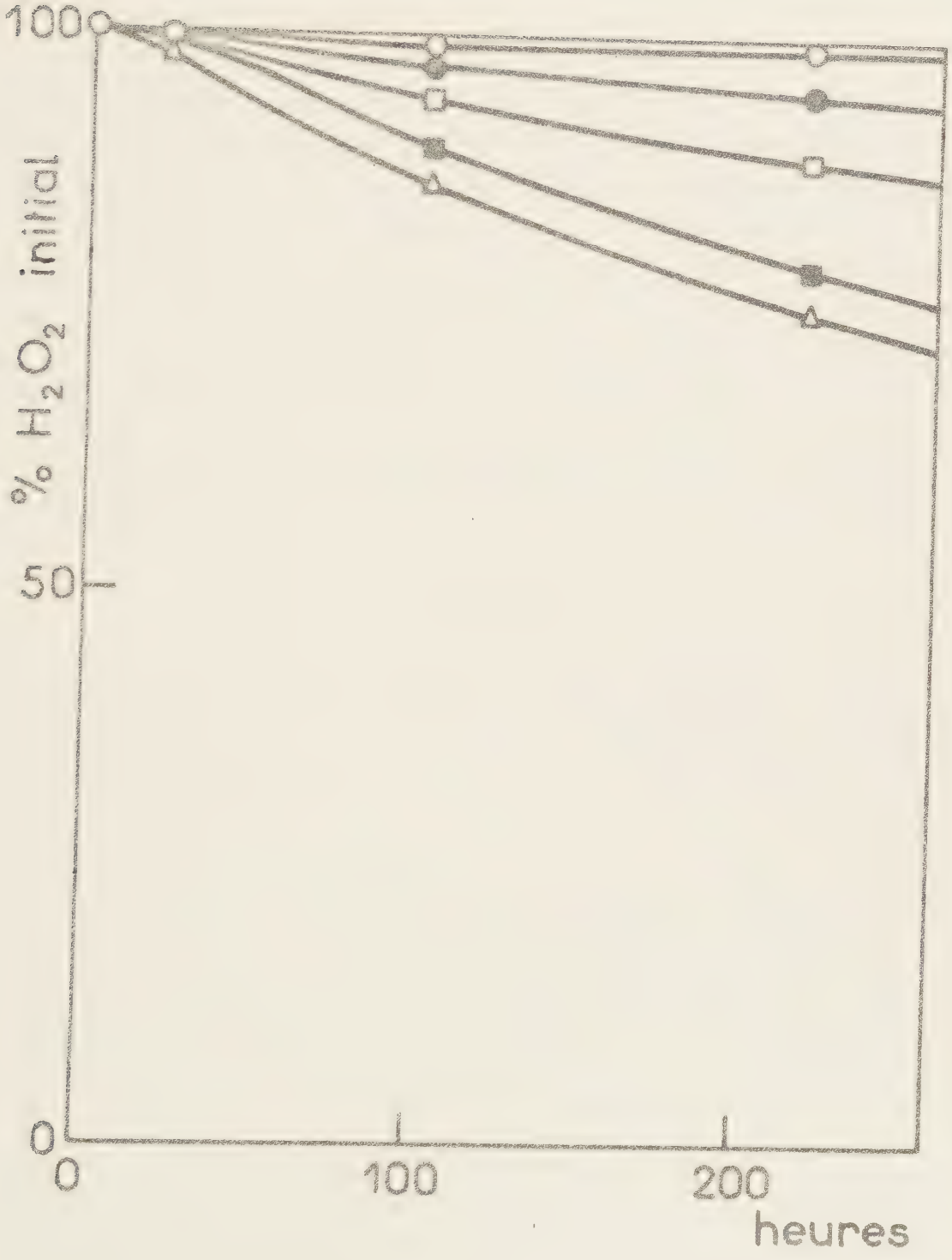
○ H_2O_2 + dGMP

◍ H_2O_2 + dAMP

□ H_2O_2

▨ H_2O_2 + dTMP

△ H_2O_2 + dCMP


100
% H_2O_2 initial
50
0
0
100
200
heures

b) Influence du DNA et de ses dérivés

La figure 10 montre que le DNA stabilise considérablement l'eau oxygénée. Les nucléotides puriques agissent dans le même sens, surtout dGMP, tandis que les nucléotides pyrimidiques accélèrent un peu sa décomposition (Fig. 11). Des résultats semblables sont obtenus si l'on remplace les nucléotides par des bases. Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux que nous avons obtenus dans des conditions identiques avec l'acide persuccinique (Figures 1a et 1b). A pH 7 toutes les bases stabilisent l'acide persuccinique, mais les bases puriques le stabilisent sensiblement plus que ne le font les bases pyrimidiques.

DISCUSSION

Diluée, en milieu aqueux, H_2O_2 est un composé assez stable et peu réactif* (A pH 7, à 37° et à l'obscurité, 10 % de H_2O_2 se décompose en 190 heures (Fig. 11) alors que la même fraction d'acide persuccinique se décompose en 35 minutes seulement (Fig. 1a). Pour rendre H_2O_2 réactive, il est nécessaire de provoquer sa décomposition. Nous avons vu que provoquée et accélérée par la lumière et certains ions métalliques (de transition en particulier), cette décomposition se fait, en milieu neutre, par l'intermédiaire des radicaux $HO_2^{\bullet}$ et surtout $HO^{\bullet}$ et aboutit, en absence de substrat oxydable, à la libération d'oxygène moléculaire.

Nos résultats expérimentaux confirment l'influence décisive de petites quantités d'ions métalliques sur la décomposition de H_2O_2 et l'effet stabilisant du DNA et des purines. Dans ces conditions, il est important d'examiner

---

* Son accumulation dans la radiolyse des solutions aqueuses montre que c'est un produit de fin de chaîne.

l'influence que peuvent avoir des agents chélatants en général sur la décomposition de H_2O_2, et en particulier le DNA et ses dérivés, dont il est admis actuellement qu'ils ont un pouvoir chélatant très appréciable vis-à-vis des ions de métaux lourds. Les agents chélatants ayant la propriété de masquer plus ou moins complètement les propriétés classiques des ions, avec lesquels ils établissent des liaisons covalentes, on a souvent cherché à les employer pour éliminer des effets catalytiques indésirables dûs à des traces d'ions métalliques.

1) Influence des agents chélatants sur la vitesse de décomposition de H_2O_2

a) Inhibition

PASCAL (1960) a signalé que parmi les stabilisateurs de H_2O_2 on a trouvé les phosphates et pyrophosphates de sodium et des bases azotées hétérocycliques à 6 chaînons. Nous avons en effet constaté qu'en présence de purines, H_2O_2 se décompose plus lentement.

b) Accélération

Au contraire, dans les catalases, l'activité catalytique de l'ion Fe^{+++} sur la décomposition de H_2O_2 en $H_2O + O_2$ est considérablement augmentée par complexation de l'ion Fe^{+++} avec une base azotée hétérocyclique, la protoporphyrine IX, pour former le groupe prosthétique de l'enzyme (the Enzymes 1963). De même BAXENDALE (1952) constate que l'activité catalytique des ions Fe^{++} et Fe^{+++} est cent fois plus grande lorsque ces ions sont complexés par la 1,10 phénanthroline, le $\alpha\alpha'$bi-pyridyle ou le $\alpha\alpha'\alpha''$tri-pyridyle. Il en est de même pour le cuivre; l'ion Cu^{++} qui, à l'état libre (sulfate ou nitrate), décompose très lentement H_2O_2, voit son activité augmentée considérablement par complexation légère avec l'ion acétate (KHARMANDARYAN et coll 1931) ou plus forte avec l'ammoniaque (JACOBSON et coll.

1954) La complexation par un agent complexant plus énergique, l'éthylènediamine, se traduit par une augmentation importante, ou au contraire la disparition totale de l'activité catalytique de l'ion Cu^{++}, suivant que respectivement une ou deux molécules de ce ligande sont liées à l'ion Cu^{++} (KIRSON 1954).

2) Influence des agents chélatants sur l'activité oxydante de H_2O_2

a) Inhibition

D'une part, MELZER et TOMLINSON (1966) constatent que l'acide guanylique et le versène protègent les acides polycytidylique et polyridylique de la dégradation par H_2O_2, d'autre part BERNEIS et coll. (1964) constatent que le versène et la desferrioxamine B diminuent la dégradation par H_2O_2 d'un DNA contenant 0,01 % de fer.

b) Accélération

A l'opposé des résultats précédents, UDENFRIEND et coll. (1954) constatent que la vitesse d'hydroxylation des composés aromatiques par le système (acide ascorbique + Fe^{++} + H_2O_2) est augmentée par addition de versène. D'autre part, dans les peroxydases, l'ion ferrique qui est complexé par une porphyrine . . . , catalyse beaucoup mieux qu'à l'état libre l'oxydation de substrats variés par H_2O_2 (The Enzymes 1963).

Nous voyons que les effets des agents chélatants sur les systèmes contenant des ions métalliques et H_2O_2 sont complexes. Les récents travaux de SIGEL et coll. permettent de mieux comprendre ces effets. Ces auteurs ont étudié systématiquement un grand nombre de complexes entre des bases azotées hétérocycliques et l'ion cuivrique, en rapport avec

leur activité catalasique (catalyse de la décomposition de H_2O_2). Ils ont trouvé que cette activité est directement reliée à la vitesse de formation des complexes ternaires (ligande-Cu^{++}-H_2O_2) et qu'elle est maximum lorsque deux seulement des quatre coordinances du cuivre sont liées à l'agent chélatant, moindre lorsque sont liées et nulle lorsque les quatre sont liées. Cette constatation est valable, aussi bien lorsque le degré de coordination dépend de la nature du ligande (BRINTZINGER et ERLENMEYER 1965 ; SIGEL et MULLER 1966) que lorsqu'il dépend de l'état structural pour un même ligande (ERLENMEYER et coll. 1966). ZELL ET SIGEL (1966) ont obtenu des résultats similaires avec l'ion Nickel. SIGEL et ERLENMEYER (1966) ont montré, en utilisant comme ligandes des dérivés de l'adénine, que leurs complexes cuivriques ont aussi une activité peroxydasique (décomposition des hétérocycles de l'adénine) et qu'elle est directement reliée à leur activité catalasique si le pH est inférieur à 8,5.

Si on examine le cas d'autres ions métalliques, il est remarquable de constater que des agents chélatants de degré de coordinance 4 qui inhibent les propriétés catalytiques du cuivre, exaltent au contraire celles du fer. Ainsi, la production de H_2O_2 par le système (acide ascorbique, oxygène, ion métallique) est accélérée ou inhibée par addition de versène suivant que l'ion métallique est Fe^{+++} ou Cu^{++} respectivement (GREEN et coll. 1963). Par ailleurs, CHALK et SMITH (1954), étudiant l'influence du disalicylène-éthylène-diamine et du NN' dicyclohexyldithioamide sur l'autoxydation du cyclohexène catalysée par les ions métalliques constatent que ces agents chélatants suppriment l'effet catalytique de Cu^{++} alors qu'ils augmentent beaucoup celui de Fe^{+++}. Il nous semble possible d'admettre avec CHALK et SMITH que la différence observée tient au fait que l'ion Fe^{+++}, possédant

un degré de coordinance égal à 6, n'est pas entièrement masqué par les agents chélatants tétravalents, contrairement à l'ion Cu^{++} dont le degré de coordinance est 4.

Il nous paraît donc intéressant de retenir l'hypothèse suivante : "Les acitivités "catalasiques" et "peroxydasiques" des ions de métaux transition peuvent être exaltées ou inhibées par chélation. Elles seront généralement exaltées lorsque la chélation laissera libre deux coordinances du métal et elles seront généralement inhibées lorsque la chélation masquera totalement l'ion métallique". Cette hypothèse nous permettra de proposer une explication du mode de décomposition du DNA par H_2O_2 en présence et en absence d'ions métalliques. Elle nous induit par ailleurs à mettre en doute que l'inhibition de la décomposition de H_2O_2 par les purines et le DNA puisse être due à la chélation de l'ion Fe^{+++} par ces agents, cette chélation ne pouvant être que très partielle. Il nous semble que l'effet inhibiteur des purines et du DNA doive plutôt être attribué à la propriété qu'ont les dérivés puriques de capter et de des activer les radicaux libres produits par la décomposition de H_2O_2 et d'arrêter ainsi des réactions en chaîne aboutissant à la production d'oxygène moléculaire (MATSUSHITA et coll., 1963).

II - Action de l'eau oxygénée sur les bases puriques et pyrimidiques et leurs désoxyribonucléotides

1) Action sur les hétérocycles

Nous avons fait agir l'eau oxygénée à la concentration $4,2.10^{-3}$ M sur les bases ou les nucléotides en solution diluée (8.10^{-5} M) dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 7, à 37° et à l'abri de la lumière. Des prises sont effectuées à différents temps ; sur chaque prise on détermine la densité optique (DO) à 250 et 260 mμ ainsi qu'à la longueur d'onde d'absorption maximale (λ max) de la base ou du nucléotide sur lequel on fait agir H_2O_2. Les valeurs des rapports DO_{250}/DO_{260} demeurent constantes à peu de chose près pendant toute la durée de la réaction, indiquant que l'absorption (aux longueurs d'onde utilisées) des composés contenus dans le mélange réactionnel est presque exclusivement due à la base (ou au nucléotide) de départ. La densité optique des solutions dépend donc uniquement de leur concentration en bases intactes, et sa diminution au cours du temps permet de déterminer la quantité de bases dégradées par H_2O_2 en composés n'absorbant plus dans l'U.V.

Les résultats obtenus sont représentés figures 12 et 13.

Il est intéressant de comparer la cinétique de dégradation des hétérocycles des bases et des nucléotides sous l'action de H_2O_2 avec la cinétique de dégradation de ces même composés sous l'action de l'acide persuccinique étudiée par la même méthode et dans les mêmes conditions* (Tableau XII). Cette comparaison conduit aux remarques suivantes :

---

* Conditions similaires à celles utilisées lors de l'étude de l'action de l'acide persuccinique sur ces corps ; la reproductibilité des résultats - que risque d'affecter la présence des traces de métaux - étant assurée par l'emploi d'eau deux fois distillée sur verre, et l'utilisation de récipients néttoyés et rincés de façon strictement standardisée.

- Dans les mêmes conditions opératoires, la dégradation par H_2O_2 des hétérocycles des bases libres et de celle des déoxyribonucléotides est beaucoup plus lente que celle produite par l'acide persuccinique.

- Les bases des nucléotides sont dégradées par H_2O_2 dans le même ordre que les bases correspondante, contrairement à ce qui avait été constaté avec l'acide persuccinique.

- Les dérivés pyrimidiques sont beaucoup plus dégradés par H_2O_2 que les dérivés puriques.

Tableau XII

Action de H_2O_2 et de l'acide persuccinique sur les bases libres et les monodéoxyribonucléotides

		G	A	T	C	U
Bases	H_2O_2	1	1	8	34	6
	Peracide	18	28	21	75	32
Nucléotides	H_2O_2	0	4	16	24	-
	Peracide	60	16	25	15	-

Quantité de bases (ou de nucléotides) dégradées

$$= (DO_{to} - DO_{20h}) \times 100/DO_{to}$$

Tampon phosphate : 0,1 M, pH 7

Bases (ou nucléotides) : 8.10^{-5} M ; H_2O_2 : $4,3.10^{-3}$ M

Acide persuccinique : $4,3.10^{-3}$ M - 20 h à 37°

Figures 12 et 13

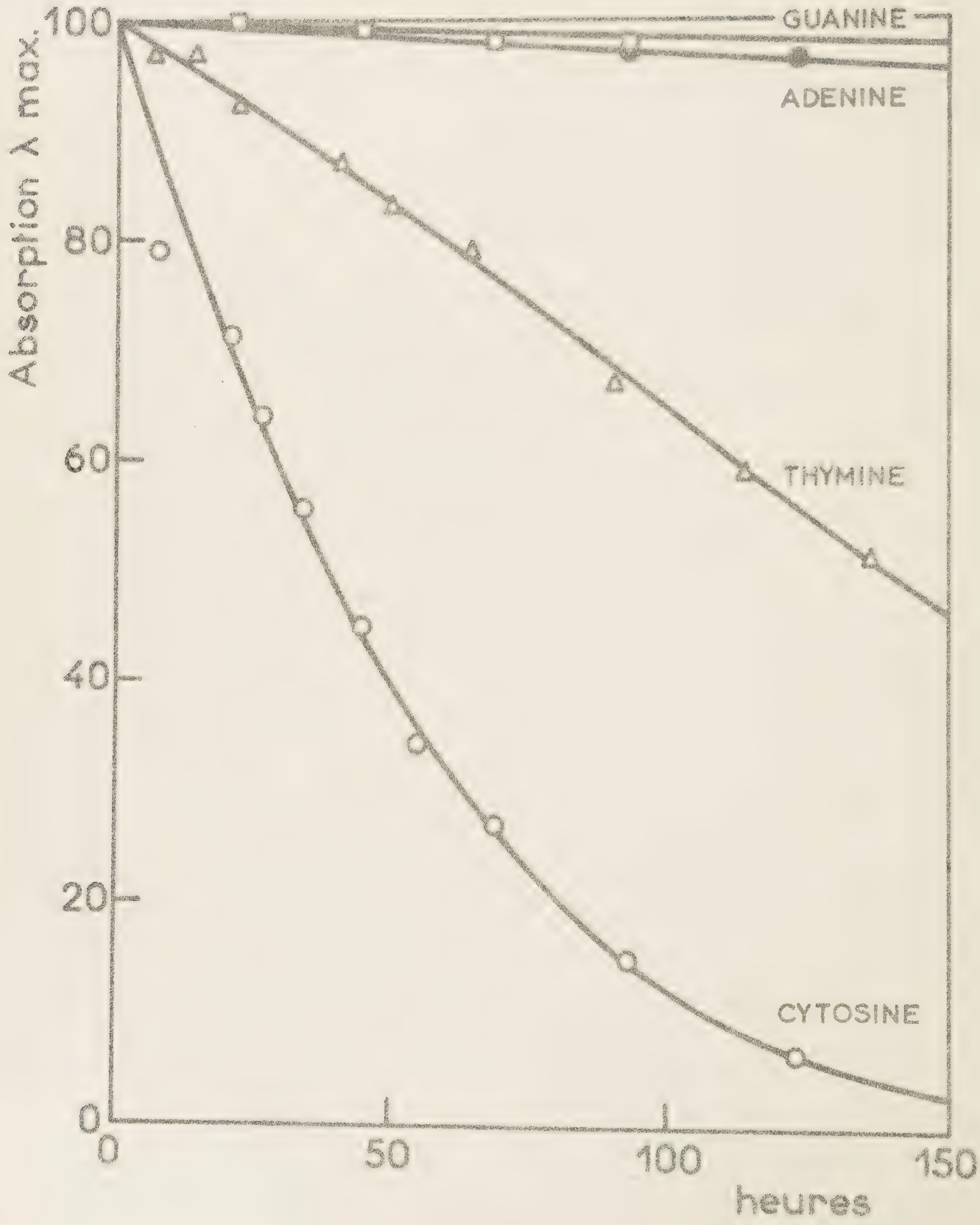
Action de H_2O_2 sur les bases et les déoxyribonucléotides libres

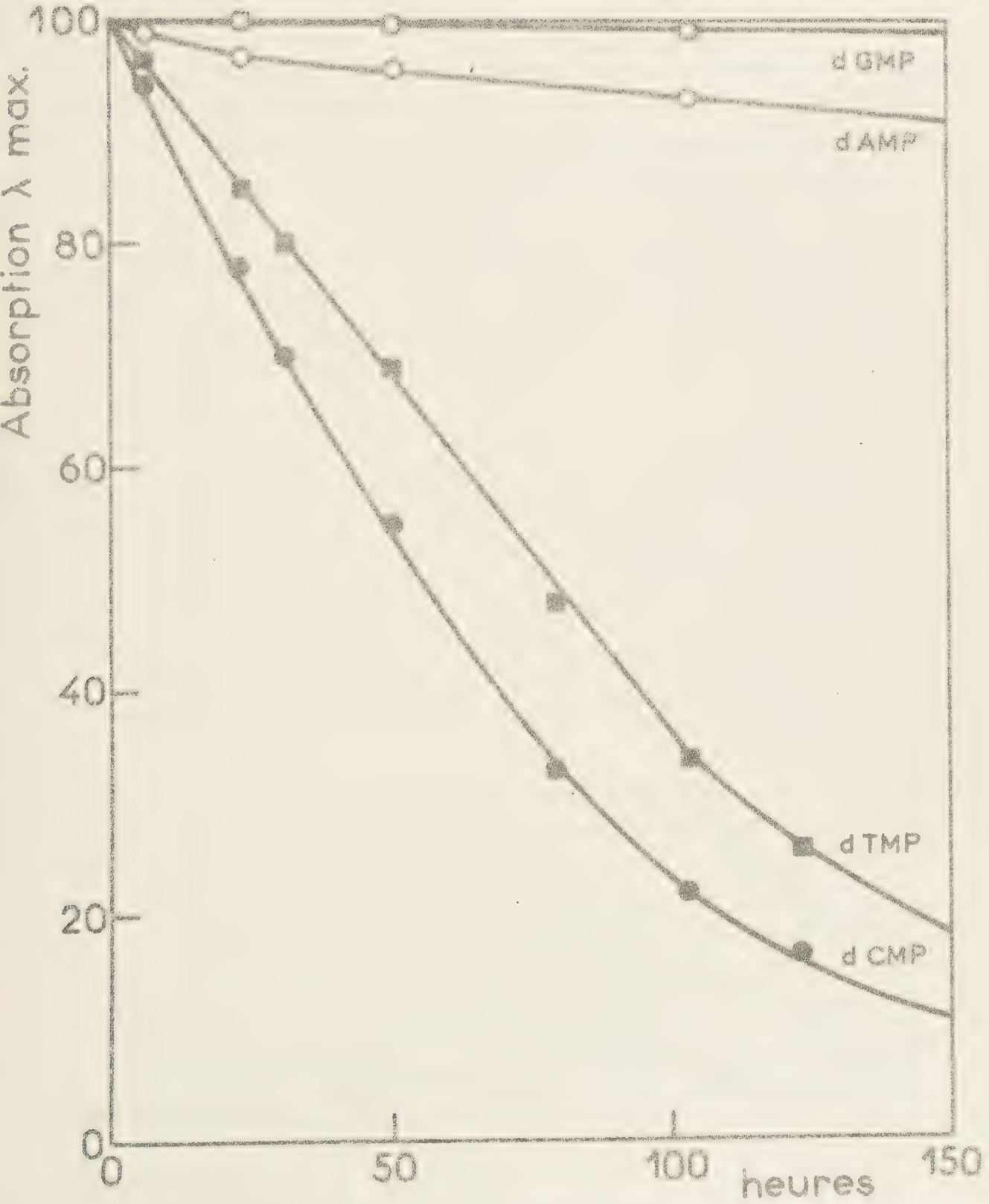
Bases et déoxyribonucléotides : 8.10^{-5} M

Eau oxygénée : $4,3.10^{-3}$ M

Tampon phosphate (Prolabo) à pH 7 : 0,1 M

Les solutions sont maintenues à 37° et à l'obscurité.


Absorption λ max.
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
heures
GUANINE
ADENINE
THYMINE
CYTOSINE


100
80
60
40
20
0
Absorption λ max.
d GMP
d AMP
d TMP
d CMP
0
50
100
150
heures

L'uracile est dégradé à la même vitesse que la thymine, la 5-méthylcytosine à la même vitesse que la cytosine ; quant aux purines (adénine, guanine, hypoxanthine, xanthine et isoguanine) elles ne sont presque pas dégradées.

Dans le but d'identifier les composés nouveaux qui pourraient se former, nous avons fait agir H_2O_2 sur des solutions concentrées d'adénine et de cytosine dans des conditions où la dégradation est beaucoup plus rapide. L'eau oxygénée (4.10^{-2} M) est mise en contact de solutions d'adénine et de cytosine ($1,3.10^{-3}$ M) à pH 5,9 en présence de sulfate ferreux (22.10^{-6} M). Les solutions, placées dans des fioles en pyrex, sont éclairées pendant 30 heures à 27° avec une lampe Philips "TL" lumière noire de 40 W placée à 10 cm. L'intensité lumineuse émise est maximum à la longueur d'onde de 3.500 Å, laquelle provoque la photolyse de H_2O_2 en radicaux HO$^{\cdot}$, (SCHUMB et coll. 1955).

Au bout de 30 heures, l'eau oxygénée restante est détruite par agitation avec de la mousse de platine pendant 1 à 2 jour à 37°.

Les spectres U.V. des solutions d'adénine avant et après traitement sont à peu près homothétiques, la modification essentielle est une diminution importante de la densité optique des solutions (45 %). Dans le cas de la cytosine, la dégradation est encore beaucoup plus intense (ceci est en accord avec les résultats obtenus en solution diluée) ; après traitement, la densité optique de la solution à 260 mμ n'est plus que 2 % seulement de la densité optique initiale ; de plus, le spectre de la solution traitée est différent de celui de la cytosine (le pic d'absorption à 267 mμ a disparu).

Nous voyons donc que, dans ces conditions expérimentales, les principales modifications observées sont les ouvertures des cycles de l'adénine et surtout de la cytosine avec formation de composés n'absorbant plus dans l'U.V.*. D'après les spectres U.V. des produits résiduels, on peut aussi s'attendre à trouver dans les fractions absorbant dans l'U.V., essentiellement de l'adénine dans le premier cas alors qu'il doit y avoir des composés nouveaux à côté de la cytosine dans le 2e cas. C'est ce que confirment les analyses chromatographiques.

Les solutions ont été évaporées à 30° dans un dessicateur sous vide et les résidus redissouts dans un minimum d'eau. La chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans trois solvants différents de la solution de cytosine traitée par H_2O_2 a permis de mettre en évidence, dans chaque solvant, 6 composés différents dont 4 ou 5 sont fluorescents. Il semble que l'un d'entre eux soit la cytosine d'origine ; un autre pourrait être, d'après les Rf, de l'acide isobarbiturique ; quant aux autres composés, ils n'ont pas été identifiés.

En ce qui concerne l'adénine, ce n'est qu'en utilisant une grande quantité de matériel traité, qu'il nous a été possible de séparer trois taches (Rf : 0,12 - 0,20 et 0,54) dans le solvant butanol, acide acétique, eau : 4/1/1. La dernière, la plus importante (98,3 %), est de l'adénine ; la première est à peine visible ; quant à la deuxième (1,7 %), d'après son Rf et ses spectres U.V. à différents pH, elle semble correspondre à de la 4,6 diamino-5-formamidopyrimidine.

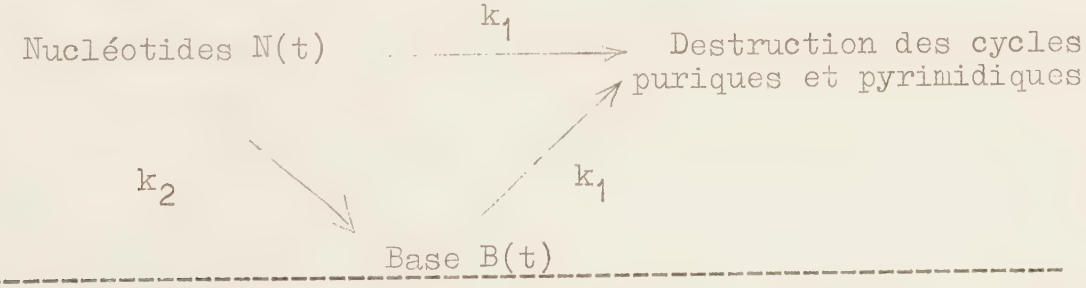
---

* Il pourrait aussi y avoir formation de glycols en 4,5 de la cytosine.

2) Action sur les liaisons déoxyribose-phosphate et déoxyribose-base

Pour déterminer si H_2O_2 provoque des ruptures des liaisons phosphate-déoxyribose ou déoxyribose-base des déoxyribonucléotides, nous avons fait agir H_2O_2 sur des solutions de nucléotides concentrées ($1,6.10^{-3}$ M) de façon à pouvoir effectuer une analyse chromatographique des nucléotides ainsi traités. Après 24 heures de contact avec H_2O_2 (0,085M) à 37° et à pH 7, des fractions de 0,5 cm^3 de chaque solution sont concentrées par évaporation à 40° sous courant d'azote puis chromatographiées sur papier. Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé un solvant (alcool tétrahydrofurfurylique - alcool propylique normal - citrate de potassium 0,8 M, pH 8 : 1/2/1) permettant d'obtenir une bonne séparation entre les nucléotides, dont les taches restent près de l'origine, et les nucléosides ou bases, qui migrent considérablement ; nous avons ainsi constaté que la plus grande partie des produits contenus dans les solutions de nucléotides soumis à l'action de H_2O_2 restent près de l'origine, donc sous forme nucléotidique ; mais on détecte en outre une certaine quantité de produits dont la migration importante indique qu'il s'agit soit du nucléoside, soit de la base, correspondant au nucléotide étudié , Tableau VI (A, B, C, D). Pour déterminer lequel de ces deux types de produits de dégradation se forme lors de l'action H_2O_2 sur les nucléotides, nous avons d'une part examiné les spectres des produits ainsi isolés, après élution de leurs taches dans du tampon phosphate 0,01 M à pH 7, et d'autre part effectué la chromatographie des nucléotides traités par H_2O_2 avec d'autres solvants. Nous avons ainsi pu déterminer avec certitude que, dans le cas de la déoxycytidine 5'-phosphate, H_2O_2 provoque la libération de cytosine (et non de déoxycytidine) et que, dans le cas de

la déoxyadénosine-5' phosphate, H_2O_2 libère de l'adénine, En ce qui concerne la thymidine-5' phosphate, les résultats sont moins certains mais indiquent qu'il s'agit plutôt de la base. Pour la déoxyguanosine-5' phosphate, nos données expérimentales ne permettent pas de trancher la question. Cependant, si on tient compte des résultats obtenus dans le cas des dérivés isolés après action de H_2O_2 sur les autres déoxyribonucléotides, il semble vraisemblable que H_2O_2 libère aussi la base de la déoxyguanosine-5' phosphate. Nous voyons (Tableau VI) que l'eau oxygénée libère une quantité, faible mais mesurable, des bases des nucléotides de départ, aussi bien lorsque les cycles des nucléotides de départ sont dégradés à 70 % (pyrimidines) que lorsqu'ils sont très peu dégradés (purines), tandis que après l'action de l'acide persuccinique, aucune libération de bases n'a été mise en évidence, alors que le taux de dégradation des hétérocycles des nucléotides traités atteint de 60 à 80 %. Si l'on admet que les cycles puriques et pyrimidiques des nucléotides sont dégradés en une étape* avec une constante de vitesse k_1 du 1er ordre par rapport aux nucléotides, en composés n'absorbant plus dans l'U.V., que les cycles des bases sont dégradés avec la même vitesse (Figs. 12 et 13), et que les bases sont libérées avec une constante de vitesse k_2 du 1er ordre par rapport aux nucléotides, (voir le schéma ci-dessous) :



* Cette hypothèse ne pose de difficultés de principe que pour les purines lesquelles ont deux cycles absorbant dans l'U.V. - Nous l'avons cependant vérifiée dans le cas de l'adénine (voir la discussion).

il est possible, moyennant ces hypothèses, d'évaluer les constantes k_1 et k_2 à partir des concentrations en nucléotides N(t) et en bases B(t) trouvées dans le mélange pour t = 24 heures. Le calcul donne en effet :

$$\frac{B(t)}{N(t)} = e^{k_2 t} - 1 \sim k_2 t \qquad (B(t) \ll N(t))$$

$$\frac{N(t)}{N(o)} = e^{-(k_1 + k_2)t}$$

Les résultats rassemblés dans le Tableau XIII montrent que les bases sont libérées plus rapidement des nucléotides pyrimidiques que des nucléotides puriques, mais que par contre, par un même taux de dégradation des hétérocycles, la libération des bases puriques est plus importante que la libération des bases pyrimidiques.

Tableau XIII

	Cytosine	Thymine	Adénine	Guanine
N(t) (μmoles)	0,422	0,660	0,814	0,719
B(t) (μmoles)	0,0072	0,0154	0,0071	0,0039
$100 \cdot \frac{B(t)}{N(t)}$	1,71	2,33	0,87	0,54
N(t) / N(o)	0,329	0,407	(1,07)	0,927
$100\ k_2 / k_1$	1,57	2,65	$\gg 10$	7,75

N(o) : Nucléotides présents dans la solution avant action de H_2O_2

N(t) : Nucléotides restant au bout de **t** = 24 h de traitement par H_2O_2

B(t) : Bases présentes à t = 24 heures

k_1 : Constante de vitesse de la destruction des hétérocycles

k_2 : Constante de vitesse de la libération des bases à partir des nucléotides.

DISCUSSION

Nous avons vu que les peracides, de par leur structure, agissent essentiellement par apport d'un atome d'oxygène, tandis que l'eau oxygénée agit par l'intermédiaire des radicaux $HO_2^{\bullet}$ et surtout $HO^{\bullet}$, lesquels arrachent un atome d'hydrogène au composé organique qu'ils rencontrent (SCHOLES 1963). Ces radicaux $HO^{\bullet}$ et $HO_2^{\bullet}$ sont aussi produits par l'action des radiations ionisantes sur les milieux aqueux, en présence d'air. Nous allons discuter nos résultats en les comparant, d'une part à ceux que nous avons obtenus avec l'acide persuccinique, et d'autre part avec ceux que d'autres auteurs ont obtenus avec les radiations ionisantes.

1°) H_2O_2 agit plus lentement que l'acide persuccinique, cette différence est certainement due à la grande différence de stabilité de ces deux agents.

2°) Le fait que, contrairement à l'acide persuccinique et comme les radiations ionisantes (SCHOLES 1963), H_2O_2 dégrade les hétérocycles des nucléotides dans le même ordre préférentiel, et à la même vitesse que les bases correspondantes, s'accorde très bien avec la nature radicalaire de son mode d'action. Les radicaux $HO^{\bullet}$, d'une part à cause de leur neutralité électrique doivent être relativement peu sensibles à des modifications locales de charges électroniques consécutives à la fixation du groupe déoxyribose-phosphate à la base ; d'autre part, à cause de leur petite taille, ils ne doivent pas être affectés par les modifications stériques que cette fixation entraîne. Il en est évidemment tout autrement avec l'acide persuccinique, électrophile d'une part, beaucoup plus encombrant que les radicaux $HO^{\bullet}$ d'autre part.

3) Les purines sont beaucoup plus résistantes que les pyrimidines. Cette différence a déjà été constatée par BUTLER et CONWAY (1953) dans l'action de H_2O_2 sur l'adénosine et la thymine et par PRIESS et ZILLIG (1965) dans l'action de H_2O_2 en milieu faiblement alcalin sur les ribonucléotides ; elle est nettement plus prononcée qu'avec les radiations ionisantes. Dans ce dernier cas, SCHOLES (1963) explique la résistance des purines par la réversion de produits d'oxydation instables (cf. ci-dessous). Nous pensons que cette propriété qui donne, semble-t-il, aux purines leur caractère de capteurs de radicaux libres (MATSUSHITA et coll. 1963), doit aussi se manifester en présence des radicaux issus de la décomposition de H_2O_2 ; mais dans ce dernier cas son effet serait plus intense parce qu'il aurait en plus pour conséquence d'inhiber les réactions en chaînes produisant de nouveaux radicaux à partir de H_2O_2. Cette hypothèse a aussi l'avantage d'expliquer l'effet stabilisant des purines sur H_2O_2.

4) En ce qui concerne les sites d'action de l'eau oxygénée sur les bases, nous pouvons déjà constater qu'ils diffèrent sensiblement de ceux de l'acide persuccinique, ce dernier agent formant facilement des 1-N-oxydes avec l'adénine, la cytosine aussi bien que leurs nucléosides et nucléotides, alors que nous n'avons jamais observé la formation de ces composés avec H_2O_2.

Pour comparer les sites d'action de H_2O_2 avec ceux sur lesquels agissent les radiations ionisantes, il convient de préciser si l'irradiation a été effectuée en milieu aéré ou non. En milieu oxygéné, en effet, agissent essentiellement les espèces oxydantes $HO^\bullet$ et $HO_2^\bullet$ quand le solvant est l'eau.

EKERT et MONIER (1959 et 1960) et SCHOLES et WEISS (1960) ont montré qu'en milieu aqueux aéré les rayons X et les rayons γ provoquent la formation de 4 hydroxy-5 hydroperoxydes sur les pyrimidines. Ces composés n'absorbant pas

dans l'U.V., nous ne les avons pas détectés par les méthodes employées, mais il est probable que leur formation, ainsi que les ruptures consécutives des cycles (en particulier pour la cytosine), soient responsables de la diminution relativement rapide de la densité optique à 260 mμ des pyrimidines traitées par H_2O_2. En ce qui concerne les purines, en milieu oxygénée, HEMS (1960) constate qu'après irradiation de solutions aqueuses d'inosine, adénosine, guanosine, xanthosine, AMP5' et GMP par des électrons de 15 MeV, les seuls produits absorbants aux U.V., décelables en-dehors d des produits de départ, sont les bases correspondantes ; or, étant donné que la destruction d'un seul des deux cycles imidazole par exemple), n'entraîne pas la perte de l'absorption U.V., SCHOLES (1963) en déduit que l'addition des espèces oxydantes sur la liaison centrale C4 - C5 est le seul processus qui mène à la destruction des cycles. Nous pensons que cette explication rend compte aussi du résultat obtenu dans la dégradation de l'adénine par H_2O_2 : lorsque 45 % de l'adénine primitive a été dégradée, moins de 1 % seulement l'a été par ouverture d'un seul cycle (sans doute le cycle imidazole avec formation de 4,6 di-amino 5 formamidopyrimidine). Les hydroxyhydroperoxydes ou les glycols formés par cette réaction d'addition (analogues à ceux des pyrimidines) sont sans doute très instables (ils n'ont jamais été identifiés), et leur formation doit être rapidement suivie de la rupture de la molécule ou de la restauration de la base de départ, avec départ de H_2O_2 ce qui expliquerait aussi les effets décrits plus haut, à savoir la stabilisation de H_2O_2.

En absence d'oxygène, les radiations engendrent la formation des espèces réductrices $H^\bullet$ et H_2O^- à côté de l'espèce oxydante $HO^\bullet$. Dans ces conditions, l'irradiation des dérivés puriques (Bases, nucléosides et nucléotides) par

des électrons de 15 MeV (HEMS 1958 et 1960) ou par des rayons γ (PONNAMPERUMA 1962), entraîne l'ouverture des liaisons C8 - N9 avec formation des formamidopyrimidines correspondantes. Par ailleurs PONNAMPERUMA (1962) et LATARJET et coll. (1961) ont constaté également la déamination de la cytosine, de l'adénine et de la guanine et la 8 hydroxylation des purines. En ce qui concerne les pyrimidines, LATARJET et coll. (1961) ont constaté la formation des glycols en 4,5 après irradiation γ .

Il semble que l'action de l'eau oxygénée puisse, au moins en présence d'ions ferreux, s'apparenter aussi à l'action, en absence d'oxygène, des radiations ionisantes. En effet, si la formation rapportée plus haut de 4,6 diamino 5 formamidopyrimidine à partir d'adénine n'est pas certaine, nous verrons plus loin que ce composé a été identifié sans ambiguité, de même que de l'hypoxanthine, après traitement, du DNA dans les mêmes conditions. Il faut sans doute attribuer la formation de ces deux composés aux propriétés réductrices de l'ion ferreux.

5) En dernier lieu, nous allons examiner l'action de H_2O_2 sur les liaisons déoxyribose-base : nous avons vu que H_2O_2 libère, à partir des nucléotides, des quantités appréciables de bases, alors que l'acide persuccinique n'en libère pas de quantités détectables pour un même taux de dégradation des hétérocycles. BUTLER et CONWAY (1963) trouvent de même que l'adénosine est très peu dégradée par H_2O_2, mais transformée dans leurs conditions en adénine à raison de 6 %. L'irradiation par les rayons X de solutions aqueuses aérées de nucléosides et de nucléotides (SCHOLES et WEISS 1952) ou par les électrons de 15 MeV en présence d'oxygène (HEMS 1960), de même que par les rayons γ sous vide (PONNAMPERUMA 1962) produit la libération des bases sans qu'apparaissent ni

ribose libre, ni nucléosides : les auteurs cités, en particulier SCHOLES, WEISS et PONNAMPERUMA en concluent que la libération des bases vient de la modification du ribose. Cette conclusion nous semble applicable aussi au cas de la dégradation par H_2O_2 et pour les mêmes raisons : nous n'avons jamais obtenu de déoxyribonucléosides par l'action de H_2O_2 sur les déoxyribonucléotides, ni comme nous le verrons plus loin, lors de son action sur le DNA. Il semble donc vraisemblable que H_2O_2, comme les radiations ionisantes, dégrade le sucre et que l'acide persuccinique soit sans action sur lui.

Il ressort de l'analyse que nous venons de faire, que l'action de H_2O_2 sur les bases et les nucléotides du DNA est beaucoup plus proche de celle des radiations ionisantes que de celle de l'acide persuccinique :

- Les cycles des bases sont dégradés avec à peu près la même intensité dans les bases libres que dans les nucléotides libres, quand on fait agir H_2O_2 ou les radiations ionisantes ; cela n'est pas le cas lorsqu'on fait agir l'acide persuccinique.

- Les sites d'action privilégiés de H_2O_2 et des radiations ionisantes sur les bases semblent être les liaisons C4 - C5, C8 - N9 et les groupes amines primaires, tandis que les N1 de l'adénine et de la cytosine sont les sites privilégiés d'action de l'acide persuccinique.

- L'eau oxygénée et les radiations ionisantes libèrent les bases des nucléotides, sans doute par destruction du sucre, tandis que l'acide persuccinique qui ne libère pas de bases ne doit pas réagir avec le sucre.

Ces analogies entre l'action de H_2O_2 et celle des radiations ionisantes en milieu aqueux sont très vraisemblablement dues à ce que dans les deux cas l'intermédiaire essentiel est l'espèce active, le radical hydroxyle HO°.

III) Action de l'eau oxygénée sur le DNA

Nous avons vu que H_2O_2 dégrade beaucoup les hétérocyles des pyrimidines et peu ceux des purines, ceci étant valable aussi bien en ce qui concerne les nucléotides libres que les bases libres. Elle agit aussi en libérant les bases des nucléotides par action sur le déoxyribose. Il nous a paru intéressant de déterminer si ces effets s'observaient également lorsqu'on fait agir H_2O_2 sur le DNA où les nucléotides sont intégrés dans une structure organisée, et quelles en sont les conséquences du point de vue de l'intégrité de la macromolécule.

Nous avons essentiellement étudié la dégradation du DNA par H_2O_2 en suivant la diminution de sa masse moléculaire en fonction du temps par diffusion de la lumière. Le type de cinétique observé varie en fonction des conditions expérimentales (Eclairement : cf. Fig. 19 ou présence d'ions métalliques: cf. Fig. 23). Nous avons ainsi été amenés à développer un calcul statistique susceptible de permettre l'analyse et l'interprétation de ces différentes cinétiques.

1) Modification de la composition chimique du DNA

a) En absence d'ions métalliques

La méthode employée est la même que celle utilisée lors de l'étude de l'action de l'acide persuccinique sur le DNA : après action de H_2O_2, la solution de DNA (thymus de Veau) est dialysée contre un petit volume d'eau distillée pour récupérer les dérivés dialysables qui ont été détachés du DNA, puis après dialyse extensive, le DNA est lyophilisé et analysé par chromatographie sur papier après hydrolyse formique selon la technique décrite au chapitre I.

Les résultats, rassemblés dans les colonnes A et B du tableau XIV montrent que la perte en bases du DNA est beaucoup plus petite qu'après action de l'acide persuccinique, tandis que la masse moléculaire diminue beaucoup plus. On constate que le déficit par rapport au phosphore est à peu près le même pour chacune des quatre bases, un peu plus accusé peut-être pour la guanine, tandis qu'après action de H_2O_2 sur les bases ou les nucléotides libres, nous avons observé une dégradation très sélective des deux pyrimidines. Les composés dialysables absorbants à 260 mμ représentent à peu près la moitié des bases manquant dans le DNA alors qu'après action de l'acide persuccinique, ces composés n'en représentaient qu'une faible fraction. L'analyse chromatographique, en isopropanol-HCl, de ces composés a permis d'identifier de la cytosine et de l'adénine.

b) <u>En présence d'ions métalliques</u>

Cette étude a été faite parallèlement, et dans les mêmes conditions, que l'étude décrite plus haut (§ II,1), de l'action de H_2O_2 sur l'adénine et la cytosine. La solution de DNA (V 268) $1,4.10^{-3}$ M dans du tampon acétate 0,1 M à pH 6 est mise en contact de H_2O_2 en excès (4.10^{-2} M) et de SO_4Fe (22.10^{-6} M), ce qui correspond à un ion Fe^{++} pour 60 nucléotides du DNA. De façon à avoir une dégradation suffisante des bases pour pouvoir en effectuer la détermination avec une bonne précision, nous avons éclairé les solutions (mises dans des fioles en pyrex) pendant 30 heures à 27° avec un tube Philips "TL, lumière noire" de 40 Watts, placé à 10 cm. Après 30 heures, l'eau oxygénée restante est détruite par agitation avec de la mousse de platine. Les spectres U.V. des solutions de DNA, avant et après action de H_2O_2, sont à peu près homothétique. On constate seulement une augmentation de la densité optique de 7 %. La solution, contenant 45 mg de DNA, a été

Tableau XIV

Composition chimique du DNA traité par H_2O_2

Récupération des Bases par rapport au phosphore	A	B	C
Guanine	87 %	88,5 %	78 %
Adénine	96 %	91,5 %	95,5 %
Cytosine	92 %	92 %	89,5 %
Thymine	(71 %)	91 %	87 %
Somme des bases	88,5 %	91 %	88 %
Bases dialysables	5,4 %	4,2 %	4,4 %
$\overline{M}_w$	$0,13.10^6$	$0,64.10^6$	$0,18.10^6$

Conditions expérimentales

A : DNA, échantillon PFI 1 : 0,1 mg/ml - H_2O_2 : $1,7.10^{-3}$ M Tampon succinate à pH 7 : 0,1 M - Temps d'action : 31 heures à 37° et à l'obscurité.

B : DNA, échantillon V 268 : 0,22 mg/ml - H_2O_2 : 20.10^{-3} M - Tampon phosphate Merck à pH 7 : 0,1 M - Temps d'action : 394 heures à 25° à la lumière du jour.

C : DNA, échantillon V 268 : 0,46 mg/ml - H_2O_2 : 40.10^{-3} M - Tampon acétate à pH 6 : 0,1 M - Fe^{++} : 22.10^{-6} - Temps d'action : 30 heures à 27° avec éclairement par un tube philips de 40 W placé à 10 cm ($3.000 < \lambda < 4.200$ Å).

Figure 14

Chromatographie sur gel de Séphadex G 25 d'un DNA de thymus de veau (V 268) traité par H_2O_2 dans les conditions suivantes :

DNA : $1,4.10^{-3}$ M

H_2O_2 : 4.10^{-2} M

SO_4Fe : 22.10^{-6} M

Tampon acétate à pH 6 : 0,1 M

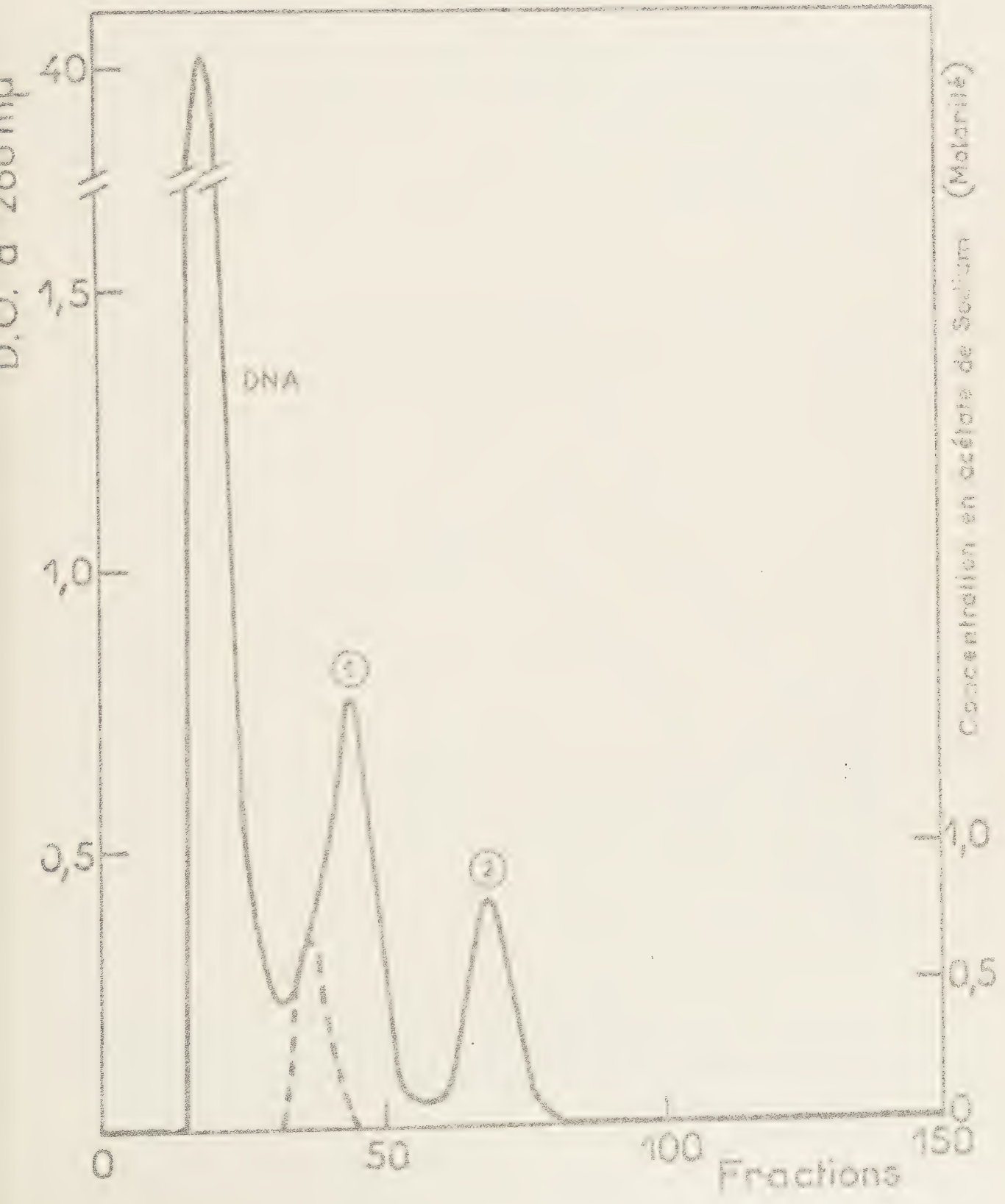
La solution est éclairée pendant 30 heures à 27° avec une lampe Philips "TL, lumière noire" de 40 W placée à 10 cm émmettant entre 3.000 et 4.200 Å.

Eluant pour la chromatographie : carbonate d'ammonium 0,01 M à pH 9

(1) : Pyrimidines libres

(2) : Purines libres

L'élution de l'acétate de sodium est représentée en pointillé.


D.O. à 260 mμ
40
1,5
1,0
0,5
DNA
1
2
0
50
100
150
Fractions
Concentration en acétate de Sodium (Molarité)
1,0
0,5
0

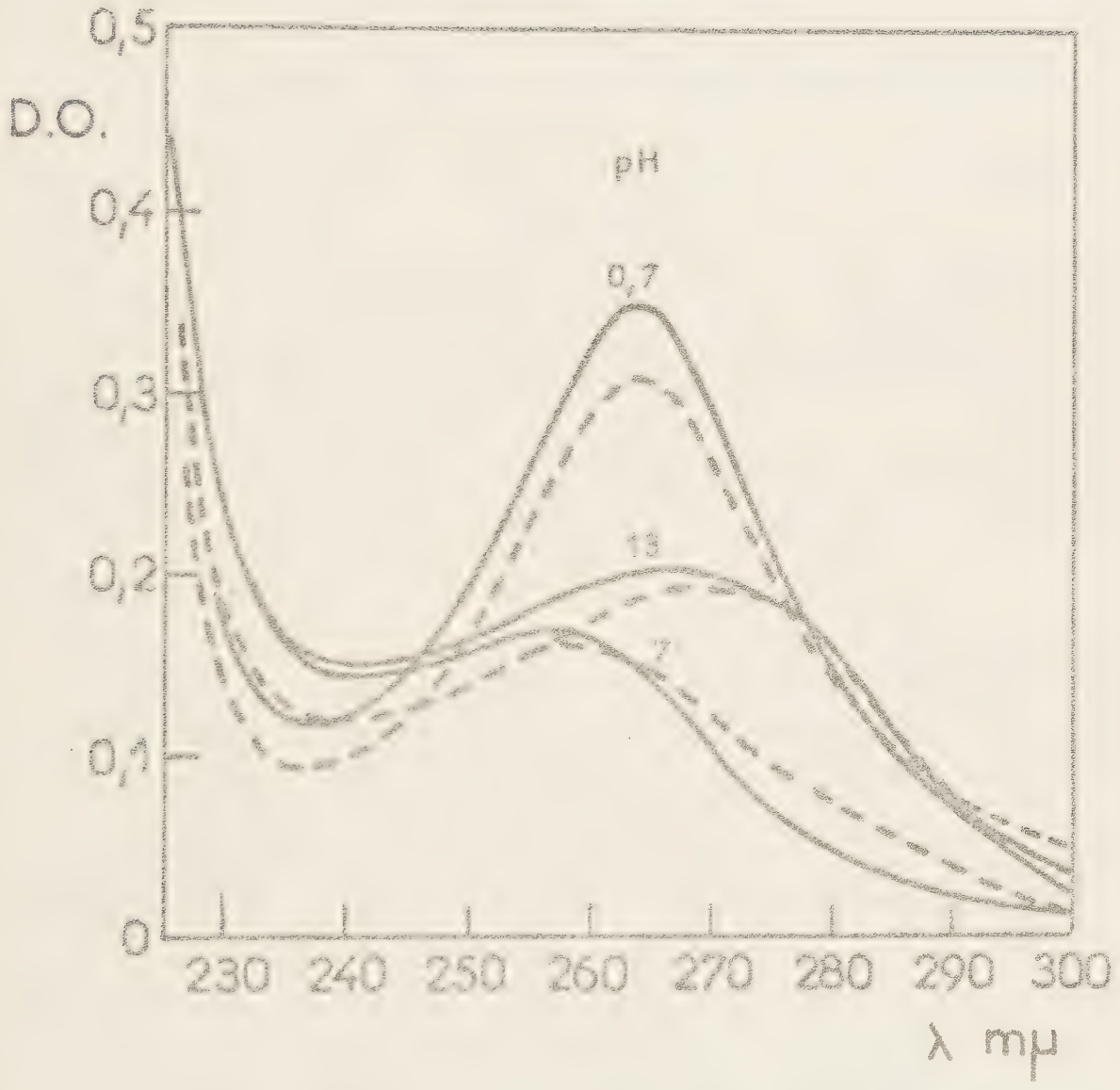
évaporée à 30° dans un dessicateur sous vide pour réduire son volume à 5 ml. Par chromatographie sur gel de Séphadex (voir chap. I), nous avons obtenu une séparation en trois fractions (Fig. 14) : le DNA, les pyrimidines (fraction 1) et les purines (fraction 2). Les densités optiques relatives de ces différentes fractions étaient respectivement 94,9 % ; 3,8 % et 1,3 %.

La fraction contenant le DNA a été lyophilisée puis analysée par la méthode décrite au chapitre I. Les résultats (Tableau XIV, C) montrent que la dégradation, relativement faible (12 %), est très similaire avec celle que l'on a observé en faisant agir H_2O_2 sur le DNA en absence d'ions ferreux.

La fraction (2) et la partie de la fraction (1) exempte de sel, ont été évaporées à sec dans un dessicateur sous vide, puis redissoutes en plusieurs fois avec un peu d'eau. Les solutions ont ensuite été évaporées à 40° dans un courantd'azote et chromatographiées dans quatre solvants différents ainsi que des composés de référence. Nous avons ainsi décelé dans la fraction (1) six composés différents. Trois d'entre eux, présents en petite quantité, n'ont pas été identifiés/deux autres ont pu être identifiés à la cytosine et à la thymine d'après leurs Rf dans différents solvants ; quant au dernier, il n'a pu être identifié de façon inéquivoque à la 4-6-diamino-5 formamidopyrimidine que grâce à son spectre à différents pH (Fig. 15), ses Rf étant identiques à ceux de la guanine dans tous les solvants utilisés.

Dans la fraction (2), nous n'avons trouvé que de l'adénine et de l'hypoxanthine. Dans aucune de ces deux fractions, nous n'avons trouvé de déoxyribonucléosides ou de déoxyribonucléotides.

FIGURE 1c



SPECTRES U.V. à DIFFERENTS pH

——————— Composé C (cf. Tableau XV)

— — — — — — 4,6 diamino-5-Formamidopyrimidine

La spectrophotométrie des éluats des taches de chromatographie a permis de confirmer ces résultats et de doser les différents composés (Tableau XV). On voit que la cytosine représente à elle seule 40 % des bases libérées.

Tableau XV

Composé Cherché	Composé de Référence	pH	λ_{max} du Composé Cherché	λ_{max} du Composé de Réf.	DO_{max} (ds 3ml)	% des Composés libérés
a	—	1	260			
		7,0	264	—	0,114	~ 5,6 %
		13	266			
c	4,6diamino5	0,7	264	264	0,342	
	formamido	7,0	257	258	0,156	16,4 %
	pyrimidine	13	267,5	269	0,199	
d	cytosine	7,0	267	267	0,506	
		14	282	282	0,595	40,8 %
e	—	0	280			
		7,0	272	—	0,038	~ 1,9 %
		13	283			
f	thymine	7,0	263	264,5	0,281	
		13	~ 290	291	0,207	17,6 %
g	adénine	0	262	262,5	0,089	5,3 %
h	hypoxanthine	0	248	248	0,171	12,4 %

DISCUSSION

Nous allons d'abord examiner les deux résultats principaux concernant l'action de H_2O_2 sur les bases et les nucléotides intégrés dans le DNA (Tableau XIV) par comparaison avec son action sur les bases et les nucléotides libres :

- Le rapport du nombre de bases libérées au nombre de basesdégradées dans le même temps est bien plus grand lorsque l'eau oxygénée agit sur le DNA que lorsqu'elle agit sur les nucléotides libres. Ce résultat s'explique assez bien si, comme nous l'avons vu plus haut, la libération des bases est consécutive à une modification du déoxyribose. Dans le DNA, le déoxyribose est en effet plus accessible que les bases, parce que plus externe.

- La sélectivité de l'action sur les pyrimidines n'existe plus dans le DNA : les quatre bases manquent en effet dans des proportions comparables après action de H_2O_2 sur le DNA, il y aurait même une dégradation plus nette de la guanine (Tableau XIV). Remarquons que la disparition de cette sélectivité d'action sur ces pyrimidines vient d'une augmentation considérable de leur résistance par intégration dans le DNA et non pas d'une sensibilisation des purines à H_2O_2 consécutive à cette intégration. En effet, dans l'expérience faite en présence d'ions ferreux et à la lumière, au bout de 30 heures d'action de H_2O_2 dans les mêmes conditions sur le DNA, l'adénine et la cytosine libres, il reste encore 96 % de l'adénine et 90 % de la cytosine liés au DNA (Tableau XIV), alors qu'il ne reste plus que 53 % de l'adénine libre et seulement des traces (moins de 0,5 %) de la cytosine libre. L'augmentation générale de la résistance des bases par intégration dans le DNA est vraisemblablement due à la diminution de leur accessibilité par les réactifs (CRAMER et SEIDEL,

1963, c et d et 1964 ; MELZER et TOMLINSON, 1966) ; mais le fait que dans le DNA les pyrimidines soient aussi bien protégées de H_2O_2 que les purines, et cela malgré leur sensibilité intrinsèque beaucoup plus grande, est probablement plutôt à mettre en relation avec la propriété antioxydante des purines. Comme nous l'avons vu plus haut, cette propriété a été mise en évidence par MATSUSHITA et Coll., (1963)et par MELZER et TOMLINSON (1966), et attribuée par ces auteurs au fait que les purines sont des capteurs de radicaux libres et des agents chélatants vis-à-vis des ions Cu^{++} et Fe^{+++} (MELZER et TOMLINSON et particulier, ont trouvé que l'acide guanylique et le versène protègent les acides polyuridilique et polycytidylique de la dégradation par H_2O_2). Dans la mesure où cette interprétation est bonne, on devrait trouver que dans un mélange des quatre bases du DNA, la dégradation des pyrimidines par H_2O_2 est moins sélective que lorsque les quatre bases sont mises séparément en contact avec H_2O_2.

Examinons maintenant plus particulièrement les résultats obtenus en présence d'ions ferreux et à la lumière. La méthode analytique utilisée dans ce cas (séparation sur gel de Séphadex du DNA et des bases détachées), nous a permis de faire un bilan assez précis de l'action de H_2O_2 sur la composition chimique du DNA. Les résultats, rapportés à 100 molécules de bases du DNA natif sont rassemblés dans le Tableau XVI.

Nous avons trouvé deux bases nouvelles dans la fraction des bases libérées : l'hypoxanthine et la 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine. Cette dernière base a été mise en évidence par HEMS en 1960 après action sous vide des électrons de 15 MeV sur des solutions aqueuses d'adénosine. De même, PONNAMPERUMA a mis en évidence en 1962 la formation de ces deux composés lors de l'action sous vide des rayons γ sur les solutions aqueuses d'adénine, d'adénosine et d'acide adénylique.

Tableau XVI

	(A) DNA natif	(B) DNA traité par H_2O_2	(C) Bases perdues par le DNA	(D) Bases libérées	(E) Bases dégradées
Guanine	22,1 %	17,2 %	4,9 %	(0 %)	(4,9 %)
Adénine	27,8 %	26,6 %	1,2 %	1,5 %*	~0 %
Cytosine	22,5 %	20,1 %	2,4 %	1,8 %	0,6 %
Thymine	27,6 %	24,0 %	3,6 %	0,8 %	2,8 %
Total :	100 %	87,9 %	12,1 %	4,1 %**	~8 %

* : Somme des dérivés de l'adénine (0,23 %) + hypoxanthine (0,55 %) + 4,6 diamino-5-formamidopyrimidine (0,72 %).

** : 4,4 % avec les bases non identifiées.

L'analyse chimique du DNA natif (Col. A) et du DNA dégradé séparé par chromatographie sur gel de Séphadex (Col. B) a permis d'évaluer les fractions des bases perdues par le DNA (Col. C = Col. A - Col. B) - Les fractions des bases libérées (Col. D) ont été évaluées à partir de l'analyse des pics (1) et (2) obtenus par la chromatographie sur gel de Séphadex. Enfin les fractions des bases qui ont été dégradées en produits n'absorbant plus dans l'U.V. a été évaluée par différence (Col. E = Col. C - Col. D).

Ces résultats montrent une fois de plus l'analogie entre les modes d'action des radiations ionisantes et ceux de H_2O_2.

Nous n'avons pas trouvé dans les hydrolysats formiques du DNA traité d'autres composés que les 4 bases originelles. Il est vrai que la sensibilité de la méthode permet seulement de conclure qu'il y en a moins que 0,25 %, mais ceci est de toutes façons bien inférieur à la quantité des bases nouvelles libérées détectables grâce à la séparation sur colonne de Séphadex (1,8 % en tout). Il semble donc que les bases nouvelles aient tendance à quitter le DNA dès leur formation. Il a d'ailleurs déjà été constaté que l'ouverture du cycle imidazole de la guanine avec formation de formamidopyrimidine labilise la liaison glycosidique (HEMS 1958).

Le tableau XVI montre que les bases libérées sont essentiellement la cytosine et l'adénine et ses dérivés, tandis que les basesdégradées en produit n'absorbant plus dans l'ultraviolet sont surtout la guanine et la thymine. Nous n'avons pas trouvé de guanine libre, ceci pourrait éventuellement être attribué à une perte en cours de manipulation due à la très faible solubilité de la guanine dans l'eau. Des contrôles effectués semblent indiquer que ce n'est pas le cas. D'ailleurs YAMAFUJI et UCHIDA (1966), étudiant l'action de H_2O_2 à fortes concentrationssur le DNA trouvent aussi que la guanine, base la plus dégradée n'est pas libérée alors que l'adénine base la plus résistante est libérée en quantité appréciable. De même SINGER et FRAENKEL-CONRAT (1965) étudiant l'action de H_2O_2 sur les nucléotides en présence d'ions Fe^{++}, Fe^{+++} et de lumière constatent que l'adénine est la base la moins dégradée et que la guanine est la base la moins libérée.

La comparaison de l'action de H_2O_2 sur les bases dans le DNA, en absence et en présence d'ion Fe^{++}, est difficile à cause du manque de précision de l'analyse chimique pour des taux de dégradation relativement faibles. Les différences sont peu importantes. Il semble seulement que la dégradation de la guanine soit encore un peu plus sélective en présence d'ions Fe^{++}. On peut mettre ce résultat en rapport avec la fixation préférentielle de l'ion Fe^{+++} sur cette base (ROPARS 1966).

L'effet relativement peu important de H_2O_2 sur la composition chimique du DNA alors que l'on observe une dépolymérisation importante, nous a amenés à développer beaucoup plus l'étude de son action par des méthodes physicochimiques (plus adéquates).

2) Modification des propriétés physicochimiques du DNA

A - Théorie de dégradation d'un polymère en double chaîne par la superposition de deux mécanismes différents.

Depuis que en 1953, CRICK et WATSON ont proposé pour la structure secondaire du DNA un modèle en double hélice, qui par ailleurs a reçu de multiples confirmations expérimentales, plusieurs physicochimistes ont étudié théoriquement et expérimentalement les conséquences que devait avoir une telle structure sur les modes de dégradation du DNA par différents agents (enzymes, acide, chaleur, etc...). Ainsi, en 1956 SCHUMAKER, RICHARDS et SCHACHMAN ont essayé, à partir des mesures de viscosité en fonction du temps de solutions de DNA sur lesquelles ils ont fait agir la DNAse pancréatique, de déterminer le nombre de chaînes apparent constituant la molécule de DNA. Le résultat qu'ils ont obtenu est un nombre fractionnaire (1,47) ; ils en ont conclu que cette valeur est compatible avec une structure en double chaîne à condition d'admettre, soit qu'il préexiste dans la molécule une interuption de chaîne pour 3.000 nucléotides, ou dans la solution 5 % de molécules en simple chaîne, soit qu'il y ait une liaison sur 400 dont la coupure entraîne la rupture de la molécule ; soit encore que chaque coupure de chaîne entraîne une augmentation de flexibilité de la molécule.

Ces auteurs n'ont pas envisagé le cas général où les réactions élémentaires entraînant la rupture de la molécule en une ou en deux étapes indépendantes auraient des constantes de vitesse différentes. D'autre part, leur théorie, adaptée aux mesures de viscosité, fait intervenir des paramètres de configuration des molécules qui compliquent l'interprétation des résultats expérimentaux.

En 1961, CAVALIERI et ROSENBERG ont proposé un mode de représentation de la diminution au cours du temps de la masse moléculaire du DNA traité par un agent dégradant (DNAse pancréatique, rayons X), permettant de déterminer le nombre n d'étapes indépendantes nécessaires pour provoquer la rupture d'une molécule. Souvent les valeurs de n sont comprises entre 1 et 2 (BERNARDI et SADRON 1964). De tels résultats donnent une indication d'ordre qualitatif : ils indiquent qu'il y a superposition de deux mécanismes de dégradation, mais ne permettent pas d'évaluer leurs importances relatives.

Enfin, en 1961 APPLEQUIST propose de représenter l'inverse de la racine carrée de la masse moléculaire en fonction du temps de dégradation. Dans cette représentation, les points expérimentaux doivent s'aligner sur une droite si la rupture de la molécule se fait en deux étapes indépendantes. La présence de coupures préexistantes dans la molécule de départ n'affecte la droite qu'au début de la dégradation. Ceci est un avantage si l'on veut observer la dégradation en deux étapes, mais ne permet pas d'évaluer, à l'instar de la représentation de CAVALIERI et ROSENBERG, les importances relatives de deux mécanismes superposés.

Nous avons élaboré un calcul statistique de dégradation d'un polymère en double chaîne dans un cas général qui tient compte des paramètres suivants, non envisagés par les auteurs cités ci-dessus :

- La dégradation se fait par la superposition de deux mécanismes différents.

- Les liaisons entre monomères, dont la coupure* entraîne la rupture* de la molécule par l'un ou l'autre de ces

---

*Nous utiliserons le terme "coupure" pour désigner la rupture d'une chaîne simple et le terme "rupture" pour désigner la rupture du polymère.

mécanismes se coupent avec des vitesses différentes.

- La probabilité qu'une quelconque de ces liaisons soit coupée n'est pas dans le cas général proportionnel au temps.

Nous supposerons qu'au temps t = 0, avant que l'agent dégradant entre en action, il y a dans l'échantillon de polymère considéré, L(0) liaisons entre monomères se répartissant comme suit :

$L_1(0) = L(0)x_1$ liaisons qui sont telles que la coupure* de l'une d'entre elles entraîne rapidement la coupure de la liaison en vis-à-vis et par voie de conséquence la rupture* de la molécule par un mécanisme que nous appellerons de 1ère espèce. Par extension et pour faciliter l'exposé, nous appellerons "liaisons de 1ère espèce" les liaisons de ce type, et "site de 1ère espèce" l'ensemble de deux liaisons de 1ère espèce situées en vis-à-vis.

$L_2(0) = L(0)x_2$ liaisons qui sont telles que la coupure de l'une d'entre elles (coupure de "2ème espèce") n'entraîne la rupture de la molécule (rupture de "2ème espèce") que si une deuxième coupure de chaîne de 2ème espèce, indépendante de la première, se produit sur l'autre chaîne, en vis-à-vis, à une distance inférieure ou au plus égale à δ monomères (Voir Fig. 16). Nous appellerons par extension "liaison de 2ème espèce", les liaisons de ce type et "site de 2ème espèce", l'ensemble formé par deux liaisons de 2ème espèce situées en vis-à-vis ou décalées de δ monomères au maximum.

Il est bien entendu que les liaisons de 1ère et de 2ème espèce peuvent dans le cas général, soit être intrinsèquement différentes, soit être intrinsèquement identiques (liaisons phosphodiester entre nucléotides par exemple), mais dans ce dernier cas, c'est la proximité d'une hétérogénéité (ion métallique ou séquence particulière de bases par exemple) qui

Pas de rupture de la molécule ($3 > \beta$) — Rupture de 1ère espèce de la molécule — Rupture de 2ème espèce de la molécule ($2 = \beta$)

Figure 16

Schéma représentant la dégradation d'un polymère en double chaîne par des mécanismes de 1ère et de 2ème espèce superposés, dans le cas où $\beta = 2$.

- ⊘ : liaison de 1ère espèce
- ○ : liaison de 2ème espèce
- · : liaison insensible à l'agent dégradant
- ↓ : "point d'impact" de l'agent dégradant.

induit une différence dans leur mode de coupure.

$L_3(0) = L(0)x_3 = L(0)\left[1 - (x_1 + x_2)\right]$ liaisons qui sont insensibles à l'agent dégradant.

Au temps t, compté depuis le début de l'action de l'agent dégradant, appelons $p_1(t)$ la probabilité pour que deux liaisons de 1ère espèce quelconques mais situées en vis-à-vis, c'est-à-dire formant un site de 1ère espèce, soient rompues :

$$p_1(t) = \frac{L_1(0) - L_1(t)}{L_1(0)}$$

Le nombre de ruptures de molécule de 1ère espèce sera donc :

$$r_1 = p_1(t)\ \frac{L_1(0)}{2} = \frac{L(0)}{2}\ x_1 p_1(t)$$

$\frac{L_1(0)}{2}$ étant le nombre de sites de 1ère espèce :

soit $p_2(t)$ la probabilité pour qu'une liaison de 2ème espèce quelconque soit rompue au temps t :

$$p_2(t) = \frac{L_2(0) - L_2(t)}{L_2(0)}$$

Si l'on considère dans l'échantillon, l'ensemble formé par les liaisons de 2ème espèce et celles qui sont résistantes à l'agent dégradant, la probabilité pour que l'une quelconque de ces liaisons soit rompue au temps t est :

$$\frac{x_2}{1 - x_1}\ p_2(t)$$

La probabilité pour que deux quelconques de ces liaisons soient rompues juste en vis-à-vis est :

$$\left(\frac{x_2}{1 - x_1}\right)^2 \quad p_2^{\,2}(t)$$

La probabilité pour qu'elles soient rompues en vis-à-vis, mais avec un décalage possible de β liaisons de part et d'autre sera $2\beta + 1$ fois plus grand soit, si l'on pose comme CAVALIERI et BENDICH (1961), : $2\beta + 1 = B$

$$B\left(\frac{x_2}{1 - x_1}\right)^2 \quad p_2^{\,2}(t)$$

Cette expression n'est valable que tant qu'il n'y a pas interférence entre les domaines comportant β liaisons de part et d'autre d'une liaison rompue. Pratiquement elle sera valable avec une bonne approximation jusqu'à un stade de dégradation assez avancé.

Les valeurs généralement admises pour le paramètre β varient, dans le cas du DNA natif, entre 2 (Valeur trouvée par THOMAS en 1956 par l'étude de la dégradation du DNA par la DNAse pancréatique) et 4(Valeur admise par SCHOLES (1961) à partir desrésultats de dégradation du DNA par les radiations ionisantes).

Au temps t, le nombre de ruptures de molécule se faisant par un mécanisme de 2ème espèce sera :

$$r_2 = \frac{L(0)}{2} \quad (1 - x_1) \; B\left(\frac{x_2}{1 - x_1}\right)^2 \quad p_2^{\,2}(t)$$

$\frac{L(0)}{2}(1 - x_1)$ étant le nombre de possibilités de choisir ces sites de rupture de 2ème espèce parmi l'ensemble formé par les liaisons de 2ème espèce et les liaisons résistantes à la dégradation. Soit en simplifiant :

$$r_2 = \frac{L(0)}{2} \; B \quad \frac{x_2^{\,2}}{1 - x_1} \quad p_2^{\,2}(t)$$

Le nombre de molécules présentes dans l'échantillon au temps t est égal au nombre de molécule présentes au temps zéro, augmenté du nombre des ruptures de molécules, soit :

$$N(t) = N(0) + r_1 + r_2$$

$$N(t) = N(0) + \frac{L(0)}{2} x_1 p_1(t) + \frac{L(0)}{2} B \frac{x_2^2}{1 - x_1} p_2^2(t)$$

Soit N_o le nombre de paires de monomères dans l'échantillon et $\overline{P_n}(t) = N_o/N(t)$ le degré de polymérisation moyen en nombre des molécules de cet échantillon considérées comme étant constituées de paires de monomères liées entre elles.

Le nombre de liaisons dans l'échantillon est égal au double du nombre de paires de monomères diminué du double du nombre de molécules, soit :

$$L(0) = 2N_o - 2N(0)$$

$$= 2N_o \left[1 - \frac{1}{\overline{P_n}(0)} \right]$$

D'où, en divisant par N_o les deux membres de l'expression de N(t) :

$$\frac{1}{\overline{P_n}(t)} = \frac{1}{\overline{P_n}(0)} + \left[1 - \frac{1}{\overline{P_n}(0)} \right] \left[x_1 p_1(t) + B \frac{x_2^2}{1 - x_1} p_2^2(t) \right]$$

soit : $$\frac{\overline{P_n}(0)}{\overline{P_n}(t)} = 1 + \left[\overline{P_n}(0) - 1 \right] \left[x_1 p_1(t) + B \frac{x_2^2}{1 - x_1} p_2^2(t) \right]$$

Si m est la masse moléculaire de la paire de monomères, on peut calculer la valeur $\overline{M_n}(t)$ de la masse moléculaire moyenne en nombre :

$$\frac{\overline{M_n}(0)}{\overline{M_n}(t)} = 1 + \left[\frac{\overline{M_n}(0)}{m} - 1 \right] \left[x_1 p_1(t) + B \frac{x_2^2}{1 - x_1} p_2^2(t) \right]$$

Cette relation est valable jusqu'à la fin de la dégradation. Si B = 1.

Dans le cas d'un polymère de haute masse comme le DNA, 1 est négligeable devant $\overline{M_n}(0)/m$, et l'expression se simplifie :

$$\frac{\overline{M_n}(0)}{\overline{M_n}(t)} = 1 + \frac{\overline{M_n}(0)}{m}\left[x_1 p_1(t) + B\,\frac{x_2^2}{1 - x_1}\,p_2^2(t)\right]$$

La masse moléculaire moyenne en nombre n'est pas accessible directement par l'expérience pour des polymères de haute masse comme le DNA. Pour passer à la masse moléculaire moyenne en poids, nous admettrons, comme les auteurs précédemment cités, que la dégradation est statistique ; nous admettrons en plus qu'elle se fait sur un ensemble de molécules dont la polydispersité est au départ "la plus probable". Cette dernière hypothèse a été vérifiée expérimentalement (voir plus loin). Dans ces conditions on démontre (CHARLESBY 1954) que le rapport $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ est égal à 2. Il ne le restera évidemment que tant que la masse moléculaire ne se rapprochera pas trop de la masse m de la paire de monomères (ce qui serait le cas en fin de dégradation et si toutes les liaisons étaient sensibles à l'agent dégradant).

Moyennant ces hypothèses on peut donc écrire :

$$\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} = 1 + \frac{\overline{M_w}(0)}{2m}\left[x_1 p_1(t) + B\,\frac{x_2^2}{1 - x_1}\,p_2^2(t)\right] \qquad (1^*)$$

*Remarque : Il est intéressant de constater que (1) peut se mettre sous la forme :

$$2m\left[\frac{1}{\overline{M_w}(t)} - \frac{1}{\overline{M_w}(0)}\right] = x_1 p_1 + B\,\frac{x_2^2}{1 - x_1}\,p_2^2$$

qui montre que dans le cas où le 2ème coefficient du viriel ne serait pas nul, mais cependant constant, au cours de la dégradation, les résultats obtenus pour les paramètres x_1, x_2, p_1 et p_2 ne dépendraient pas de la façon de $\overline{M}_w$ a été calculée (extrapolation à concentration nulle ou non).

Pour exploiter les résultats expérimentaux donnant les valeurs de $\overline{M_w}(0)/\overline{M_w}(t)$ en fonction du temps, il faut donc faire des hypothèses sur les fonctions $p_1(t)$ et $p_2(t)$.

1°) Examinons le cas le plus simple où $p_1(t) = k_1 t$ et $p_2(t) = k_2 t$, cette hypothèse déjà faite par SCHUMAKER et coll. et par CAVALIERI sera en général valable au début de la dégradation, tant que l'activité de l'agent dégradant sera constante et tant que les fractions des liaisons rompues de chaque espèce seront petites devant l'unité.

Pour simplifier l'écriture posons $C \triangleq \dfrac{\overline{M_w}(0)}{m}$, (1) devient :

$$\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} = 1 + \frac{C}{2} x_1 k_1 t + \frac{CB}{2} \frac{x_2^2}{1 - x_1} k_2^2 t^2 \qquad (2)$$

Remarquons que cette expression permet de retrouver l'équation de CAVALIERI dans le cas où $1 \leqslant n \leqslant 2$; on a en effet :

$$\log \frac{1 - R}{R} = \log\left(\frac{\overline{M_w}(0)}{n} - 1\right) = \log t + \log\left[x_1 k_1 + B \frac{x_2^2}{1-x_1} k_2^2 t\right] + \text{cste}$$

Si la dégradation est de 1ère espèce : $x_2 = 0$ et la pente est 1, si la dégradation est de 2ème espèce, $x_1 = 0$ et la pente est 2, mais dans le cas général la pente variera entre 1 et 2.

Il nous paraît donc préférable, pour interpréter les résultats expérimentaux, de tracer en fonction du temps la valeur :

$$\frac{1}{t}\left[\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} - 1\right] = \frac{C}{2} x_1 k_1 + \frac{CB}{2} \frac{x_2^2}{1 - x_1} k_2^2 t$$

$$= K + \alpha t$$

Si les points expérimentaux s'alignent sur une droite de pente α et d'ordonnée à l'origine K quelconques, c'est que les hypothèses de départ sont valables. Dans ce cas il est possible de calculer les valeurs :

$$x_1 k_1 = \frac{2K}{C} \qquad (3)$$

$$\frac{x_2 k_2}{\sqrt{1 - x_1}} = \sqrt{\frac{2\alpha}{CB}} \qquad (4)$$

Dans le cas, assez général où $x_1 \ll 1$, on peut évaluer le rapport du nombre de liaisons de 1ère espèce au nombre de liaisons de 2ème espèce coupées à un moment donné :

$$\frac{x_1 k_1}{x_2 k_2} = K \sqrt{\frac{2B}{C\alpha}} \qquad (5)$$

Remarquons que l'erreur relative commise sur ce rapport n'est que la moitié de l'erreur relative commise dans l'appréciation de B.

2°) Examinons le cas plus général où l'activité de l'agent dégradant étant toujours constante, les liaisons se coupent suivant une cinétique de pseudo 1er ordre de constante de vitesse k_i :

on a : $L_i(t) = L_i(0)\ e^{-k_i t}$

soit : $p_i(t) = 1 - e^{-k_i t}$ avec i = 1 ou 2.

L'expression 1 devient :

$$\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} = 1 + \frac{C}{2} x_1 (1 - e^{-k_i t}) + \frac{CB}{2} \frac{x_2^2}{1 - x_2} (1 - e^{-k_2 t})^2 \qquad (6)$$

Si $k_1 \gg k_2$, les ruptures de molécules par un mécanisme de 1ère espèce se seront presque toutes manifestées avant que celles de 2ème espèce aient commencé à le faire d'une façon

appréciable. On aura dans ce cas un palier de masse. La masse moléculaire au palier étant évidemment directement liée à la fraction x_1 des liaisons de 1ère espèce. Si k_1 n'est qu'un peu plus grand que k_2, on aura un point d'inflexion. Illustrons ceci par un exemple :

Soit un échantillon de molécules de DNA de masse $\overline{M_w} = 4.10^6$, on a $C = \frac{4.10^6}{6,26.10^2} = 0,64.10^4$

Supposons qu'il y ait 20 sites de ruptures de 1ère espèce dans la molécule, on aura :

$$x_1 = \frac{20}{0,64.10^4} = 3,12.10^{-3}$$

Si toutes les autres liaisons sont susceptibles de se couper par un mécanisme de 2ème espèce, on aura :

$$x_2 = 1 - x_1 \sim 1$$

Supposons que B = 5, l'expression (6) s'écrit :

$$\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} = 1 + 10\,(1 - e^{-k_1 t}) + 16.10^3\,(1 - e^{-k_2 t})^2 \qquad (7)$$

Les courbes représentatives de (7) sont tracées sur la Fig. 17 en fonction de $k_2 t$ et pour différentes valeurs du rapport k_1/k_2. On voit que si $k_2 t$ est petit (inférieur à 0,015 ou même 0,03) et si k_1 est assez petit ($k_1/k_2 < 20$), le développement limité au 1er terme des exponentielles est possible, et nous ramène au cas précédent avec $p_i = k_i t$. Nous obtenons en effet dans ce cas des paraboles pour $\overline{M_w}(0)/\overline{M_w}(t)$ (Fig. 17) et des droites pour $(1/k_2 t)\,(\overline{M_w}(0)/\overline{M_w}(t) - 1)$ (Fig. 18).

Si par contre, $k_2 t$ restant toujours petit, k_1 devient beaucoup plus grand que k_2 (c'est-à-dire que les liaisons de 1ère espèce se rompent beaucoup plus vite que celles de 2ème espèce), on voit apparaître un point d'inflexion et même un palier de masse dans la représentation de la Fig. 17. Cela se traduit dans la représentation de la Fig. 18 par des courbes de pente négative pour les petites valeurs de $k_2 t$. Pour certaines valeurs des paramètres x_1, x_2, k_1 et k_2, la quantité $(1/k_2 t)\ (\overline{M_w}(0)/\overline{M_w}(t)-1)$ peut passer par une valeur minimum par une certaine valeur de $k_2 t$ (cf. Fig. 17 pour $k_1/k_2 = 100$). Nous avons constaté ceci expérimentalement de très nombreuses fois (cf. Fig. 22).

Dans les cas où $k_1 \gg k_2$, l'apparition d'un point d'inflexion ou d'un palier de masse permet de calculer les paramètres x_1, k_1 et x_2, k_2 et non plus seulement le rapport $x_1 k_1 / x_2 k_2$.

Examinons maintenant deux applications particulières de l'expression générale (1).

a) Cas où il n'y a que des liaisons de 2ème espèce et de coupures préexistantes

Si x est la fraction des liaisons coupées au temps $t = 0$, réparties statistiquement dans l'échantillon, on peut admettre pour le calcul que cet échantillon de molécules de masse moléculaire $\overline{M_w}(0)$ à $t = 0$, est obtenu en dégradant un échantillon de molécules intactes et de masse $\overline{M_w}^{\circ}(0)$ tel que, à partir de (1) :

$$\frac{\overline{M_w}^{\circ}(0)}{\overline{M_w}(0)} = 1 + \frac{\overline{M_w}^{\circ}(0)}{2m} Bx^2$$

Figure 17

Courbes représentatives de l'équation (7) ci-dessous :

$$\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} = 1 + 10\ (1 - e^{-k_1 t}) + 16.10^3\ (1 - e^{-k_2 t})^2$$

Les courbes représentatives de cette équation sont tracées en fonction de $k_2 t$ et pour différentes valeurs du rapport k_1/k_2 variant de 0 à 1.000.

FIGURE 17

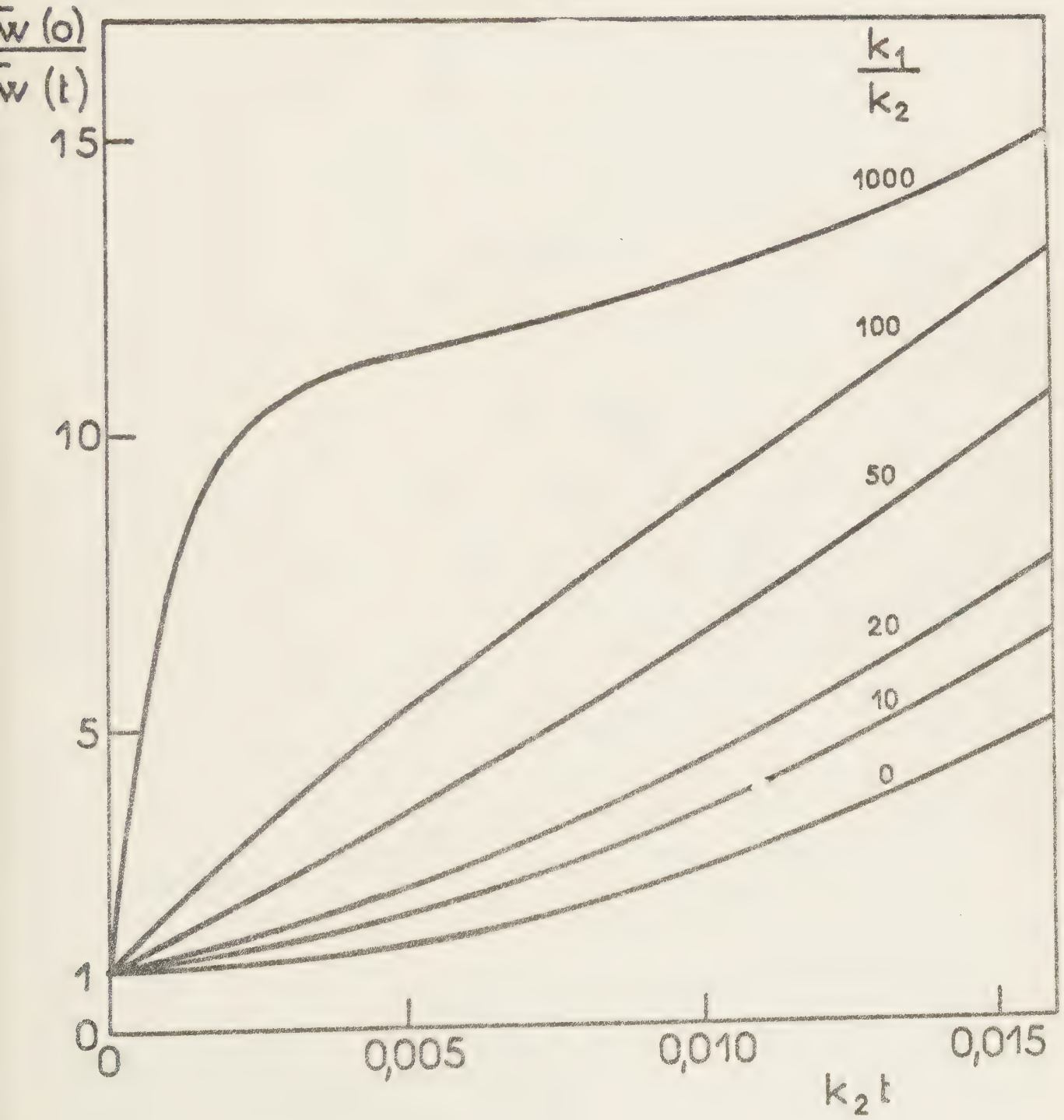


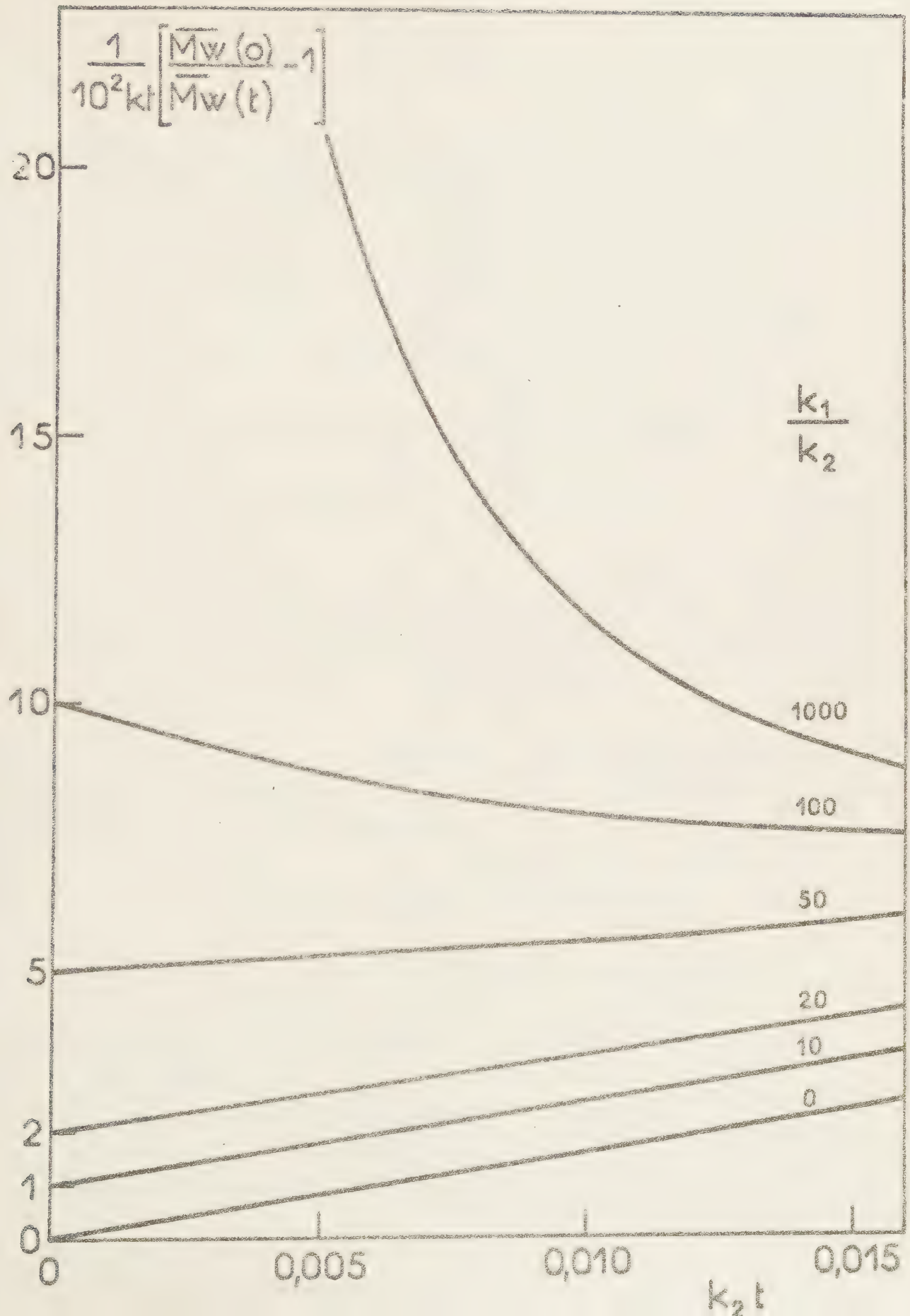
Figure 18

Courbes représentatives de variations de la quantité :

$$\frac{1}{10^2 k_2 t}\left[\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} - 1\right]$$

en fonction de $k_2 t$ et par des valeurs de rapport k_1/k_2 variant de 0 à 1.000.

La valeur de $\overline{M_w}(0) / \overline{M_w}(t)$ est celle de l'équation (7), voir aussi Fig. 17.


$\frac{1}{10^2 k_1 t}\left[\frac{\overline{Mw}(o)}{\overline{Mw}(t)} - 1\right]$
20
15
10
5
2
1
0
0
0,005
0,010
0,015
$k_2 t$
$\frac{k_1}{k_2}$
1000
100
50
20
10
0

Au temps t on aura, p(t) étant la probabilité pour qu'une liaison quelconque soit rompue depuis t = 0 :

$$\frac{\overline{M}_w^{\circ}(0)}{\overline{M}_w(t)} = 1 + \frac{\overline{M}_w^{\circ}(0)}{2m} B\,(x + p(t))^2$$

D'où par division membre à membre :

$$\frac{\overline{M}_w(0)}{\overline{M}_w(t)} = \frac{1 + \frac{\overline{M}_w^{\circ}(0)}{2m_o} B(x + p(t))^2}{1 + \frac{M_w(0)}{2m} Bx^2}$$

$$\frac{\overline{M}_w(0)}{\overline{M}_w(t)} - 1 = \frac{\frac{\overline{M}_w^{\circ}(0)}{2m} B\left[(2xp(t) + p^2(t))\right]}{1 + \frac{M_w^{\circ}(0)}{2m} Bx^2}$$

x est généralement très petit, ainsi il est de l'ordre de 2.10^{-4} pour l'échantillon V 268 de DNA de thymus. On aura donc dans ce cas $\overline{M}_w^{\circ}(0) \sim \overline{M}_w(0)$ et $(\overline{M}_w^{\circ}(0)/2m)Bx^2 \sim 1$ à 3.10^{-3} ce qui est petit devant 1 dans ce cas.

L'expression se simplifie donc :

$$\frac{\overline{M}_w(0)}{\overline{M}_w(t)} \sim 1 + \frac{\overline{M}_w(0)}{2m} B\left[2xp(t) + p^2(t)\right] \qquad (8)$$

Remarque : Cette expression est équivalente à l'équation (16) de SCHUMAKER et coll. (1961) si l'on ne considère que le début de la dégradation. On peut en effet écrire dans ce cas: $\overline{M}_w(0)/\overline{M}_w(t) = 1 + \varepsilon$ soit $\overline{M}_w(t)/\overline{M}_w(0) \sim 1 - \varepsilon$. De même il est possible de retrouver les expressions 19a et 19b de SCHUMAKER ; posons comme plus haut $\overline{M}_w(0)/m = C$:

$$R = \frac{\widetilde{M_w}(t)}{\widetilde{M_w}(0)} \sim 1 - CBxp(t) - \frac{CB}{2} p^2(t)$$

$$\frac{1 - R}{p(t)} \sim CBx + \frac{CB}{2} p(t), \text{ d'où l'on tire :}$$

$$x = 1/2 \ \frac{\text{ordonnée à l'origine}}{\text{pente}}$$

$$2\beta + 1 = B = \left(\frac{2}{C}\right) \text{pente}$$

L'utilisation de ces deux dernières formules nécessite la connaissance de p(t) c'est-à-dire le dosage des liaisons rompues au cours du temps. Il est plus simple et tout aussi précis de prendre pour le DNA natif les valeurs les plus couramment admises de B et d'admettre que p = kt ce qui est certainement valable dans les premiers stades de la dégradation, dans ce cas (8) devient :

$$\frac{\widetilde{M_w}(0)}{\widetilde{M_w}(t)} \sim 1 + \frac{\widetilde{M_w}(0)}{2m} B \ (2xkt + k^2t^2)$$

d'où :

$$\frac{1}{t}\left[\frac{\widetilde{M_w}(0)}{\widetilde{M_w}(t)} - 1\right] \sim BCxk + \frac{BC}{2} k^2t$$

Posons :

$$\frac{1}{t}\left[\frac{\widetilde{M_w}(0)}{\widetilde{M_w}(t)} - 1\right] = K + \alpha t$$

Il vient :

$$x \sim \frac{K}{\sqrt{2BC\alpha}} \qquad (9)$$

b) Calcul du nombre total de coupures de chaînes par molécule initiale

Il peut être important de résoudre ce problème dans le cas général où la molécule est susceptible de se rompre par la superposition des mécanismes de 1ère et de 2ème espèce, en particulier dans les cas de l'inactivation, soit d'un DNA transformant, soit de l'infectuosité d'un DNA viral.
Le nombre de liaisons de 1ère et de 2ème espèce coupées par molécule $\overline{M}_w(0)$ sont :

$$S_1 = \frac{2\overline{M}_w(0)}{m} x_1 p_1(t) \quad (\text{Ex : } S_1 = 2$$

$$S_2 = \frac{2\overline{M}_w(0)}{m} x_2 p_2(t) \quad (\text{Ex : } S_2 = 3$$

Si x_1 est petit devant l'unité, (1) peut s'écrire :

$$\frac{\overline{M}_w(0)}{\overline{M}_w(t)} \sim 1 + \frac{S_1}{4} + \frac{B}{8} \frac{m}{\overline{M}_w(0)} S_2^2 \qquad (10)$$

Sachant que :

$$\frac{S_1}{S_2} = \frac{x_1 p_1}{x_2 p_2} \sim \frac{x_1 k_1}{x_2 k_2}$$

au début de la dégradation, il est possible de calculer le nombre total $S = S_1 + S_2$ de coupures élémentaires de chaîne dans une molécule, à partir des valeurs de $\overline{M}_w$ en fonction du temps.

Dans le cas par exemple où $\overline{M}_w(0) = 4.10^6$, $B = 5$, $x_1 = 0{,}01$ et $x_2 = 0{,}99$ et si les deux espèces de liaisons se coupent avec la même vitesse ($k_1 = k_2$), on trouve que lorsque la masse moléculaire moyenne en poids a diminué de moitié, le nombre total de coupures élémentaires de liaisons par molécule initiale est en moyenne $S = S_1 + S_2 = 0{,}9 + 89 \sim 90$.

Alors que s'il n'y avait que des coupures de 2ème espèce, on aurait : $S = S_2 = 100$,
et s'il n'y avait que des coupures de 1ère espèce, on aurait : $S = S_1 = 4$ coupures de chaîne (soit deux ruptures de molécule).

Avant d'appliquer cette théorie de dégradation à nos résultats expérimentaux obtenus lors de l'étude de l'action de l'eau oxygénée sur le DNA, nous allons examiner quels renseignements elle peut apporter à l'étude de deux types de dégradation du DNA étudiés dans ce laboratoire.

a) Dégradation par la DNAse acide

Comme l'ont montré BERNARDI et SADRON (1964), cette dégradation fait intervenir les deux espèces de mécanismes simultanément. Le tracé dans notre mode de représentation en $(1/t)(\overline{M}_w(0)/\overline{M}_w(t)-1)$ en fonction du temps, des résultats obtenus par ces auteurs avec un DNA d'érythrocytes de poulet donne une droite de pente α et d'ordonnée à l'origine K. Si l'on admet avec BERNARDI que les sites de 1ère espèce résultent de la présence fortuite de deux liaisons de 2ème espèce en vis-à-vis, on peut écrire :

$$x_1 = x_2^2$$

La valeur de x_2 a été déterminée par BERNARDI : la digestion s'arrêtant environ aux décanucléotides, on peut écrire : $x_2 \sim 0,1$ comme on a $x_2^2 = 10^{-2} \leqslant 1$, on peut utiliser la formule (5) qui devient :

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{K}{x_2}\sqrt{\frac{2B}{C\alpha}}$$

On trouve $k_1/k_2 = 1,2$ ou $1,6$ suivant que $B = 5$ ou 9 (soit $\beta = 2$ ou 4).

b) Dégradation par les ultra-sons

En présence d'oxygène, la dégradation du DNA par les ultra-sons semble faire intervenir deux mécanismes, mais dissociés dans le temps. Il y a d'abord une dégradation de 1ère espèce suivie d'un palier de masse puis une nouvelle diminution de la masse moléculaire, cette fois par un mécanisme de 2ème espèce. La particularité, que notre traitement théorique de ces résultats expérimentaux met en évidence, est que cette dégradation de 2ème espèce ne peut pas avoir accumulé ses coupures de chaîne depuis le temps zéro, ou, si elle l'a fait, cela indique que des pontages intermoléculaires ont eu lieu, masquant la dégradation.

Les points expérimentaux obtenus par LITZLER (résultats non publiés), dans la sonication sous oxygène de l'échantillon V 244 de DNA de thymus de veau de masse $\overline{M_w}(0) = 6.10^6$ sont bien représentés par l'équation :

$$\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} = 1 + 12{,}2\,(1 - e^{-0{,}62\,t}) + 14{,}6\left[\frac{0{,}8(t - 10)}{1 + 0{,}8(t - 10)}\right]^2$$

où le temps t est exprimé en minutes.

Nous voyons que cette équation est en bon accord avec l'expression générale (1) si l'on admet que la dégradation de 1ère espèce se fait suivant une cinétique de 1er ordre de constante de vitesse $k_1 = 0{,}62\ \text{min}^{-1}$ et que celle de 2ème espèce ne commence qu'au temps t = 10 min et se fait suivant une cinétique du 2ème ordre de constante de vitesse $k_2 = 0{,}80\ \text{mn}^{-1}$. Pour une dégradation du 2ème ordre on a en effet :

$$p = \frac{kt}{1 + kt}$$

On peut encore calculer les fractions x_1 et x_2 des liaisons susceptibles de se rompre par un mécanisme de 1ère ou de 2ème espèce :

$$x_1 = 24.10^{-4}$$

$$x_2 = 2,4.10^{-2} \quad \text{si } B = 5$$

B - Résultats expérimentaux

a) Action de H_2O_2 sur le DNA en absence d'ions métalliques ajoutés

α) Influence de l'intensité de l'éclairement

Nous avons vu dans l'introduction à ce chapitre, que la lumière de longueur d'onde inférieure à 3.800 Å provoque la photolyse de la molécule H_2O_2 en deux radicaux HO• très réactifs. Il est, par conséquent, intéressant de déterminer si la décomposition du DNA par H_2O_2 est sensible à la lumière, et dans quelle mesure cette décomposition peut être attribuée à une action des radicaux HO•.

On a laissé évoluer les solutions de DNA au contact de H_2O_2 dans les cellules de mesure de l'appareil Sofica. Ces solutions sont mises à l'obscurité ou éclairées, soit par la lumière du jour, soit par un tube Philips TLA de 40 W "lumière noire" muni d'un filtre (sulfate de cuivre) et placé à 25 cm, ou sans filtre et placé à 10 cm. La masse moléculaire $\overline{M}_w$ est déterminée par diffusion de la lumière suivant la méthode décrite au chapitre I. Sur la Fig. 19, les variations de $\overline{M}_w(0)/\overline{M}_w(t)$ sont tracées en fonction du temps. On constate que la dégradation est nulle à l'obscurité (courbe 1), très lente à la lumière du jour (courbe 2) et qu'elle croît

considérablement avec l'intensité de l'éclairement (courbes 3 et 4). Au début de la dégradation, ces deux dernières courbes sont des paraboles, conformément à ce que laisse prévoir l'expression (2) de la partie théorique. Le tracé de (1/t) $(\overline{M}_w(0)/\overline{M}_w(t)-1$ en fonction du temps (Fig. 20) donne, en effet, des droites dont l'ordonnée à l'origine K et la pente permettent de calculer les valeurs x_1, k_1 et x_2k_2 rassemblées dans le Tableau XVII (A).

On constate que ces valeurs, représentant respectivement les fractions des liaisons totales coupées par heure suivant un mécanisme de 1ère ou de 2ème espèce, croissent avec l'intensité de l'éclairement et que, dans tous les cas, le mécanisme de 2ème espèce est prépondérant ($x_1k_1/x_2k_2 < 0,04$).

Examinons le cas particulier de la courbe (2). Les points expérimentaux sont représentés pour des temps plus longs sur la Fig. 21. On constate qu'un palier apparaît entre 20 et 50 heures qui se traduit dans la représentation en (1/t) $(\overline{M}_w(0)/\overline{M}_w(t) - 1)$ par un minimum vers 100 heures (Fig. 22). On peut expliquer son existence à partir de l'expression générale (1) de la théorie de dégradation dans laquelle $p_1 = 1 - e^{-k_1 t}$ et ne peut plus être assimilé comme précédemment à $k_1 t$, la constante de vitesse k_1 étant trop grande devant k_2. La courbe représentative de l'équation :

$$\frac{\overline{M}_w(0)}{\overline{M}_w(t)} = 1 + 0,38\ (1 - e^{-108\ t}) + 0,32.10^{-4}\ t^2$$

passe d'une façon satisfaisante par les points expérimentaux ce qui permet de calculer les différents paramètres de la dégradation (tabelau XVII A). Dans ce cas aussi, les coupures de 2ème espèce sont nettement prépondérantes. Le petit palier est, en effet, explicable par la présence de moins d'une liaison de 1ère espèce en moyenne par molécule initiale.

Figure 19

Dégradation de l'échantillon V 268 de DNA de thymus de veau par H_2O_2 en fonction du temps, en absence d'ions métalliques ajoutés et pour différents éclairements.

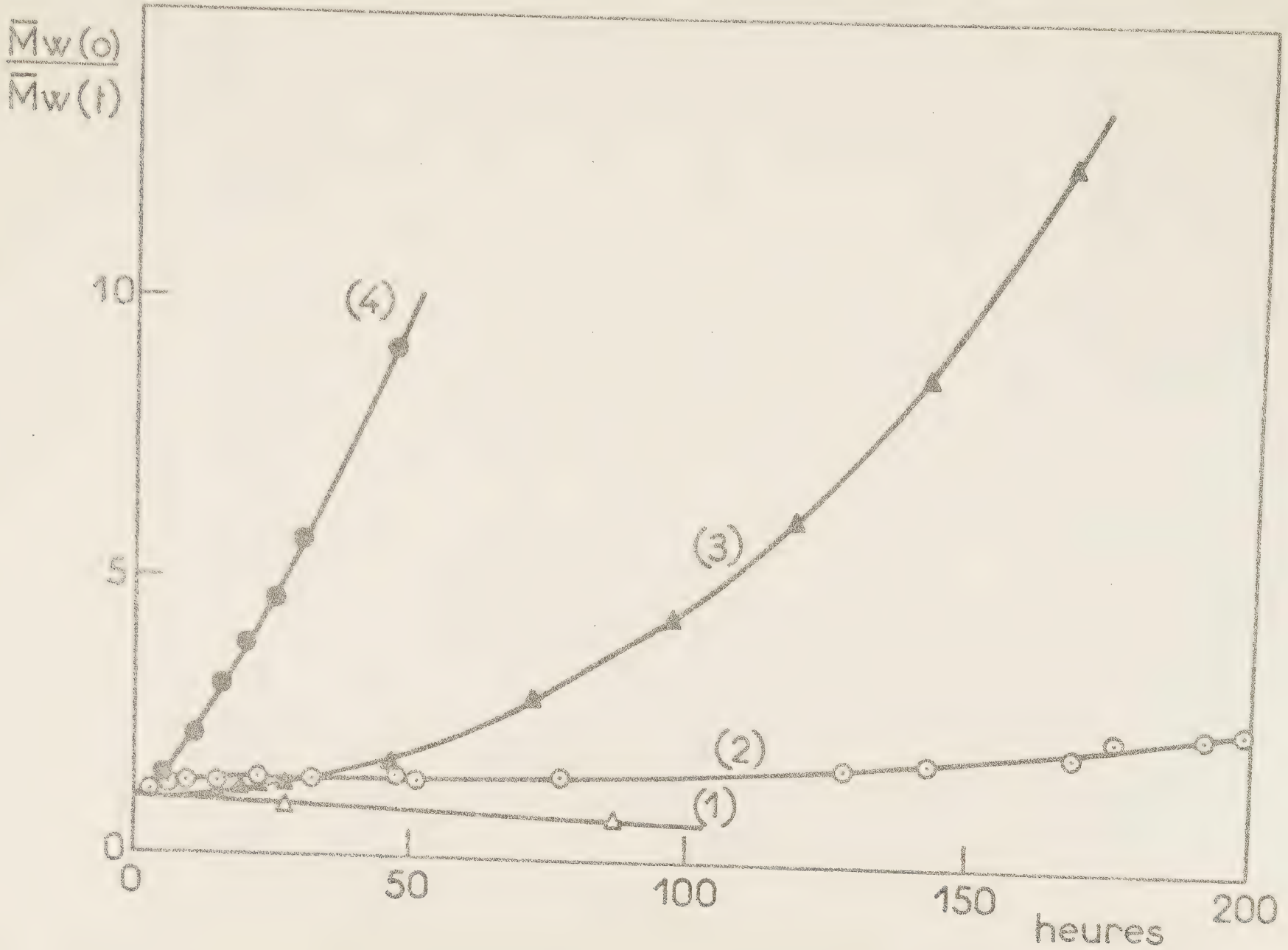
	(DNA)	(H_2O_2)	$\frac{H_2O_2}{DNA}$	Tampon	t°C	Eclairement
1)	$6,38.10^{-4}$M	$2,20.10^{-2}$M	35	Acétate 0,1 M pH 6	35°	obscurité
2)	$3,16.10^{-4}$M	$1,95.10^{-2}$M	61	Phosphate (Merck) 0,1 M pH 7	24°	jour
3)	$6,35.10^{-4}$M	$2,00.10^{-2}$M	31	SO_4Na_2 0,1 M Phosphate 0,01M (Merck) pH 6,7	~24°	Tube 40 W à 25 cm avec filtre
4)	$6,35.10^{-4}$M	$2,00.10^{-2}$M	31	idem	~28°	Tube 40 W à 10 cm

Figure 20

Représentation de :

$$\frac{10^2}{t}\left(\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} - 1\right)$$

en fonction du temps dans les cas (3) et (4).


$\frac{\overline{M}w(o)}{\overline{M}w(t)}$
10
5
0
0
50
100
150
200
heures
(1)
(2)
(3)
(4)

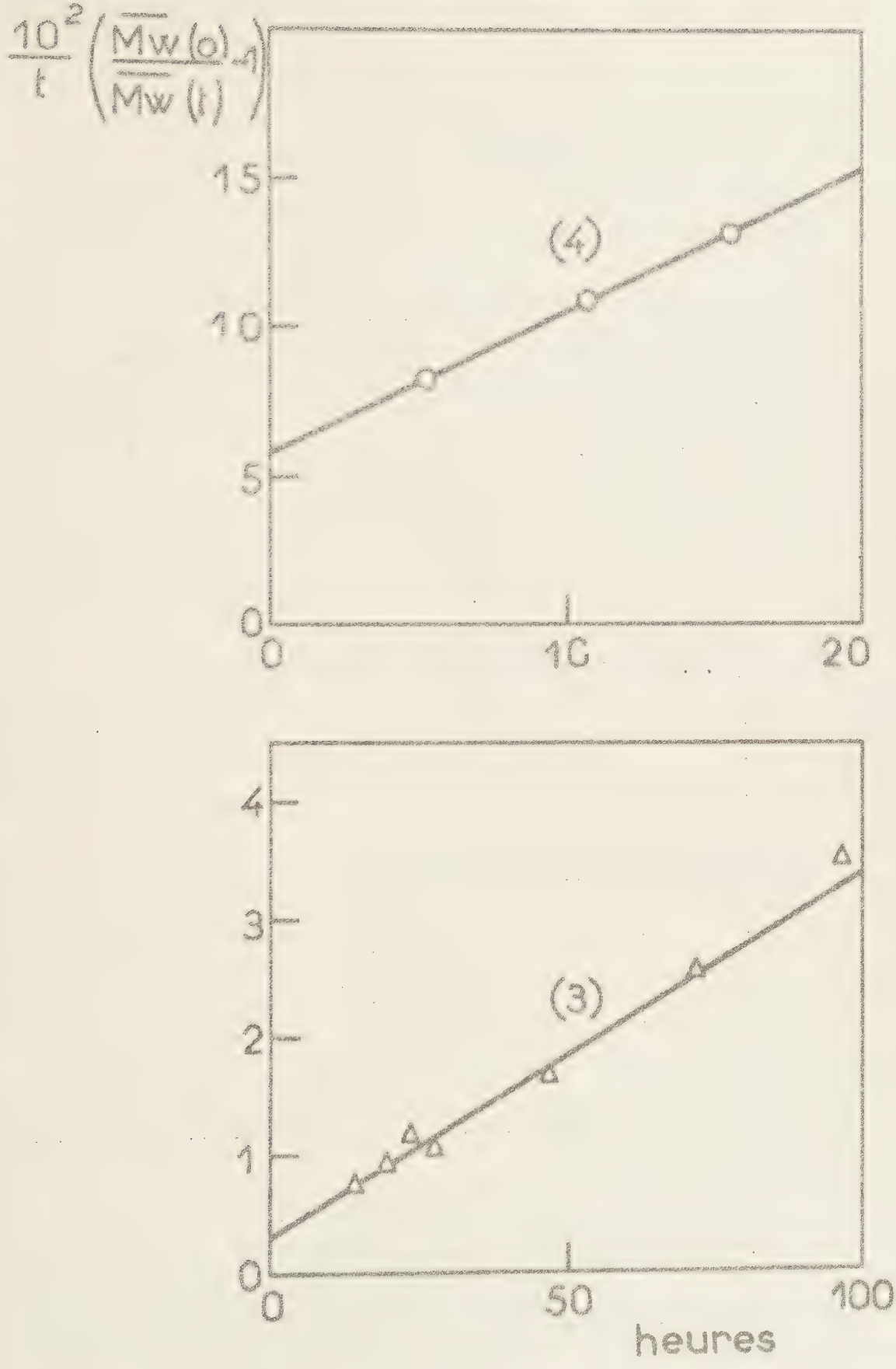

$\frac{10^2}{t}\left(\frac{\overline{Mw}(o)}{\overline{Mw}(t)}-1\right)$
15
10
5
0
(4)
0
10
20
4
3
2
1
0
(3)
0
50
100
heures

Tableau XVII

Evaluation des coupures de 1ère et de 2ème espèce dans l'action de H_2O_2 sur le DNA de thymus de veau (V 268)

	$10^{-6}\overline{M}_w(0)$	10^2 K	$10^4\alpha$	$10^6 x_1k_1$		$10^6 \frac{x_2k_2}{\sqrt{1-x_1}}$ Si $\beta=2$	Si $\beta=4$
A) Eclairement U.V. (Figs 19 à 22)							
Lumière du jour	4,1			(12,4)	$x_1=1,15.10^{-4}$ $k_1=0,11$	44	33
U.V. (1)	3,7	0,32	3,1	1,1		145	110
U.V. (2)	4,1	5,7	47,5	17,3		540	400
B) Eclairement U.V. plus ions métalliques (Figs 25 et 26)							
Cu^{++}	4,4	66	610	190		1.900	1.400
Fe^{++}	4,2	34	76	100		670	500
Fe^{+++}	4,4	26	74	73		650	480
C) Ions métalliques à l'obscurité (Figs. 23 et 24)							
Cu^{++}	3,1	18,2		73	$k_1=10^{-2}$ $k_1=73.10^{-4}$	0	0
Fe^{++}	3,2	3,3		12	$x_1 \sim 6.10^{-4}$ $k_1 \sim 2.10^{-2}$	($\sim$180)	($\sim$130)
Fe^{+++}	3,5	0,2		0,7		($\sim$100)	($\sim$ 80)

(1) tube Philips à 10 cm

(2) tube Philips à 25 cm plus filtre de sulfate de cuivre

x_1k_1 et x_2k_2 : fraction des liaisons totales du DNA coupées par heure suivant un mécanisme de 1ère et de 2ème espèce.

β : décalage maximum, exprimé en nombre de nucléotides, entre deux coupures de 2ème espèce situées en vis-à-vis et permettant la rupture de la molécule.

K et α : Respectivement: ordonnée à l'origine et pente de la droite obtenue dans la représentation en $(1/t)(\overline{M}_w(0)/\overline{M}_w(t) - 1)$ en fonction du temps.

Figure 21

Dégradation de l'échantillon V 268 de DNA de thymus de veau par H_2O_2 en fonction du temps, à la lumière du jour.

Conditions expérimentales : voir Fig. 19 (2)

⊙ : Points expérimentaux

La courbe tracée représente l'équation :

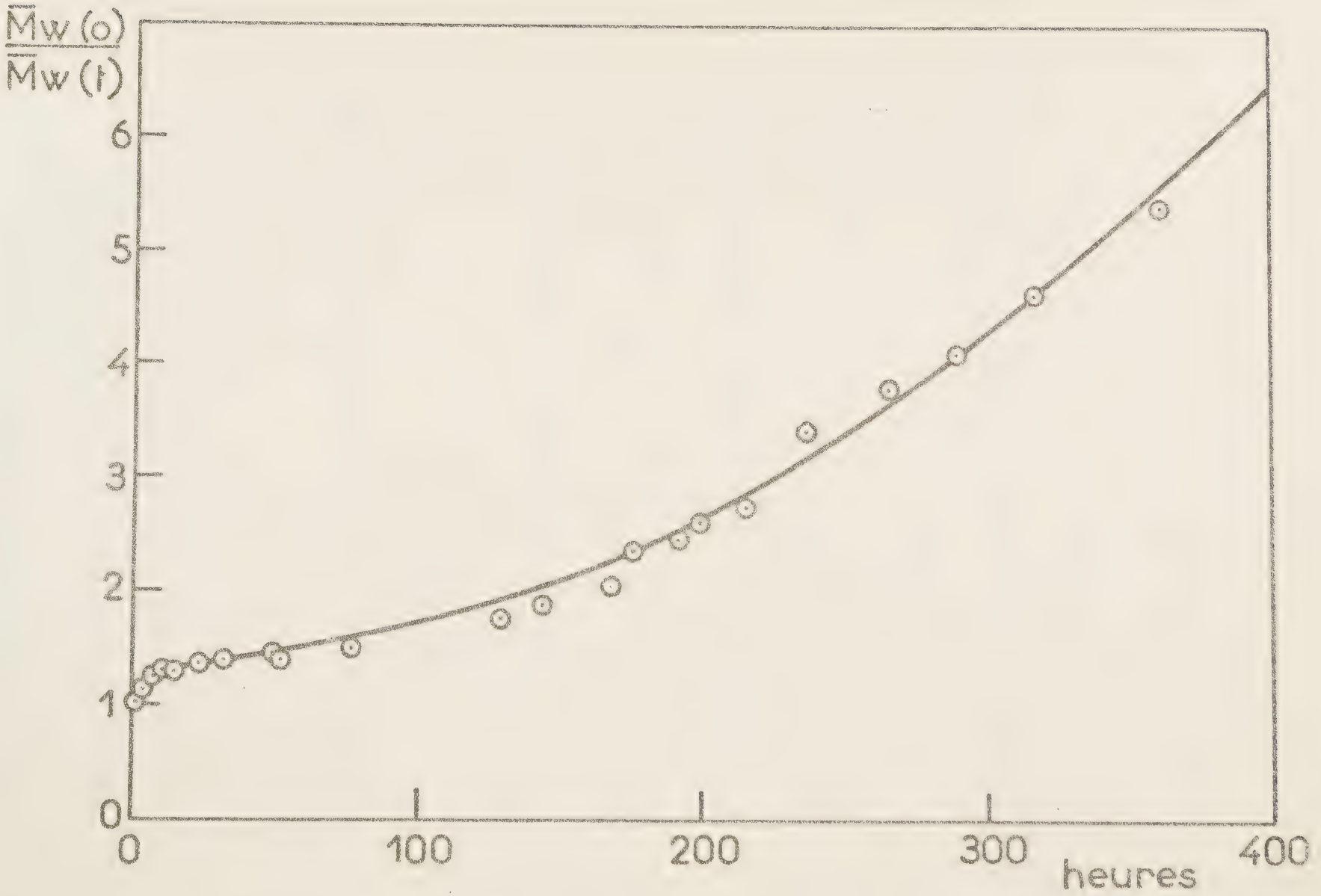
$$\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} = 1 + 0{,}38\ (1 - e^{-0{,}108\ t}) + 0{,}32.10^{-4}\ t^2$$

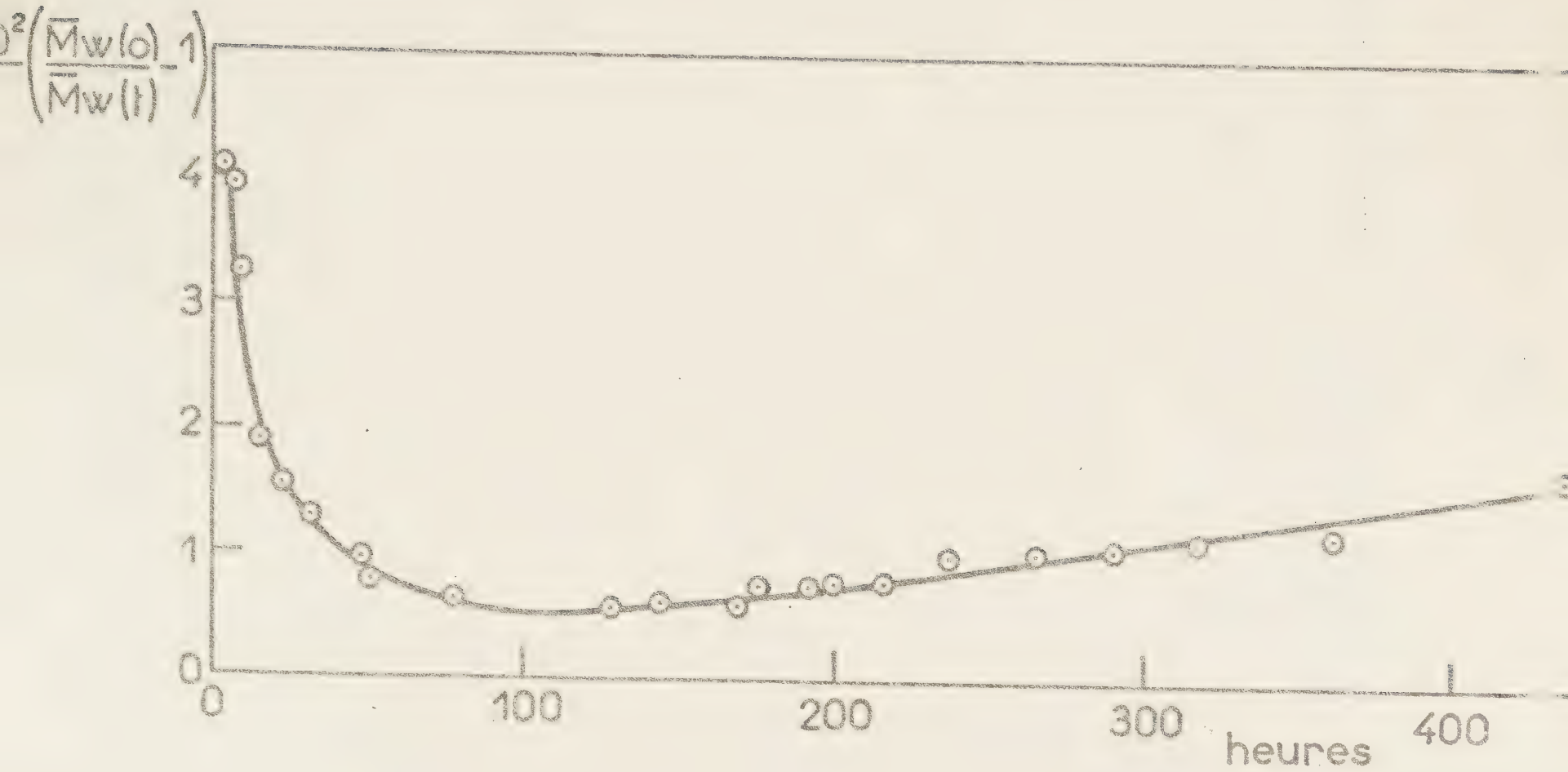
Figure 22

Représentation de :

$$\frac{10^2}{t}\left[\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} - 1\right]$$

en fonction du temps des valeurs expérimentales de la Fig. 21.


$\frac{\overline{M}w(o)}{\overline{M}w(t)}$
0
1
2
3
4
5
6
0
100
200
300
400
heures


$10^2\left(\frac{\overline{M}w(0)}{\overline{M}w(1)}-1\right)$
4
3
2
1
0
0
100
200
300
400
heures

δ) Etude de la variation de quelques paramètres physico-chimiques au cours de la dégradation

Ces mesures ont été effectuées à différents temps sur l'échantillon V 268 de DNA de thymus, au cours de la dégradation par H_2O_2 à la lumière du jour (voir ci-dessus). On voit d'abord sur le Tableau XVIII que H_2O_2, dosée par iodométrie, disparait très lentement du milieu. Elle a, de plus été mise en grand excès (60 molécules par nucléotides de DNA). Ce résultat justifie que, dans le traitement théorique de son action sur le DNA, nous ayions admis que les liaisons de 1ère et de 2ème espèce se coupent suivant une cinétique de 1er ordre : $p = 1 - e^{-kt}$.

La masse moléculaire et la constante de sédimentation diminuent parallèlement. En représentation doublement logarithmique, l'alignement rigoureux des points expérimentaux permet de déterminer la relation :

$$S^{\circ}_{20,w} = 0,578\ \overline{M}_w^{0,376}$$

dont le coefficient 0,376 est celui d'un DNA pas ou peu dénaturé (EIGNER et DOTY, 1965 ; STUDIER, 1965). Ce résultat est confirmé par l'étude des courbes de transition en NaCl 0,15 M. L'hyperchromicité développée à 100° diminue peu au cours de la dégradation, la diminution de la température de transition est plus sensible, mais la transition demeure franche. L'absorption U.V. à 260 mμ à la température ordinaire est pratiquement constante indiquant que l'effet de la dégradation des bases (9 %) est compensé par l'hyperchromicité des bases libérées du DNA et par l'hyperchromicité développée au sein du DNA du fait de sa légère dénaturation par dégradation*.

* Ces résultats permettent, ainsi que nous l'avons vérifié par comparaison avec les résultats obtenus directement par analyse chimique, d'évaluer la fraction de bases dégradées (cf. Tableau XIX).

Tableau XVIII

Variations de quelques paramètres physicochimiques d'une solution de DNA au cours de l'action de H_2O_2

Temps t	Concentration relative en H_2O_2	$10^{-6}\ \overline{M}_w$	$S^\circ_{20,w}$	$\frac{M_w}{M_n}$	$\frac{(DO_{260})t}{(DO_{260})t=0}$	$\frac{(DO_{260})100°}{(DO_{260})20°}$	Tm	% Bases libérées
0	1,00	4,3	18	1,87	1,000	1,47	86°	0
61	0,99	3,6	-	-	-	-	-	1,28 %
225	0,98	2,6	15	1,98	0,998	1,43	83°2	2,77 %
394	0,975	0,64	9	2,86	0,997	1,40	77°8	4,21 %
629	0,962	0,16	5	-	0,995	1,40	74°5	6,12 %

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles qui sont indiquées dans la légende de la Fig. 19 (courbe 2), sauf pour t = 61 et 225 heures où la concentration en DNA des solutions étudiées était double.

Les valeurs de $\overline{M_w}/\overline{M_n}$, calculées d'après la méthode indiquée au chapitre I, montrent que la polydispersité de l'échantillon est à peu près statistique ($\overline{M_w}/\overline{M_n} \sim 2$) tant que la dégradation n'est pas trop avancée. Pour des temps d'action supérieurs à 200 heures, le rapport $\overline{M_w}/\overline{M_n}$ dépasse la valeur de 2.

DISCUSSION

L'action de H_2O_2 sur les bases et les nucléotides libres, analogue à celle des radiations ionisantes et différente de celle de l'acide persuccinique, a été expliquée par la formation du radical HO• qui est l'espèce active dans les deux premiers cas. Son action principale sur le DNA en absence d'ions métalliques ajoutés (dégradation de 2ème espèce) nous amènera à la même conclusion.

Ce mécanisme de dégradation de 2ème espèce est aussi celui qui a été observé lors de l'action des radiations ionisantes sur le DNA en solution. On trouve, en effet, dans ce dernier cas que $1/\overline{M_w}$ croît comme le carré de la dose (SCHOLES 1963).

Le nombre de bases dégradées par liaison phospho-ester coupée dans le même temps est du même ordre de grandeur que celui que SCHOLES (1963) obtient à partir des résultats d'irradiation de solutions de DNA par les rayons X : G base/ G sucre $\sim$ 2,8 (Tableau XIX).

L'analogie entre l'action de H_2O_2 et des radiations ionisantes sur le DNA a été particulièrement mise en évidence par BUTLER (1963). Cet auteur a constaté que les radicaux HO• (et $HO^{\bullet}_2$) produits par la photodécomposition de H_2O_2 agissent de la même façon que ceux qui sont produits par de forte doses

Tableau XIX

Nombre de bases du DNA libérées et dégradées par H_2O_2 pour une liaison phosphoester coupée

Temps	Fraction des Bases libérées	Fraction des Bases dégradées	Bases libérées par liaison phosphoester coupée		Bases dégradées par liaison phosphoester coupée	
			$\beta = 2$	4	2	4
394 h	4,21 %	3,38 %	2,4	3,2	2,0	2,6
629 h	6,12 %	3,76 %	2,2	2,9	1,4	1,8

La fraction des bases dégradées a été calculée à partir des résultats rassemblés dans le tableau XVIII. La fraction x_2k_2t des liaisons phosphoester coupées au temps t a été calculée à partir de la valeur x_2k_2 du tableau XVII, 1ère ligne.

de rayons X : dans les deux cas, la rupture des liaisons phosphoester est la conséquence d'une oxydation préalable du déoxyribose. SCHOLES (1963) précise que l'oxydation est vraisemblablement une carbonylation en 3' entraînant la labilisation de la liaison phosphester située en 5' (élimination). D'autre part, si l'on admet avec SCHOLES que la libération des bases provient aussi de l'oxydation du déoxyribose, il apparaît que cette oxydation doit provoquer à peu près autant de coupures de liaisons phosphoester que de coupures de liaisons glycosidiques. Le tableau XIX montre qu'il y aurait environ 2 à 3 bases libérées par liaison phosphoester coupée ; ce nombre est très inférieur au nombre de bases libérées par liaison phosphoester coupée dans d'autres types de dégradations comme l'action ménagée des acides par exemple (THOMAS et DOTY, 1956) où ce rapport est égal à 200. Il nous semble donc qu'à la lumière et en absence d'ions métalliques, la dégradation du DNA par H_2O_2 puisse être attribuée à l'action des radicaux HO° agissant d'une part sur les bases en les décomposant, d'autre part sur le déoxyribose dont l'oxydation entraîne d'une part la libération des bases et, d'autre part la rupture des liaisons phosphoester.

Signalons encore qu'une preuve de l'action radicalaire de H_2O_2 sur le DNA est fournie par BERNEIS et coll. (1963) : la dégradation suivie par viscosité est inhibée par la cystéamine qui est un des plus puissants capteurs de radicaux libres connus.

La comparaison des Tableaux XVIII et VII B montre que, pour une même fraction de bases dégradées, la température de transition observée après l'action de H_2O_2 est nettement inférieure à celle qui est observée après action de l'acide persuccinique alors que les hyperchromicités développées à chaud sont les mêmes. Pour une même masse moléculaire, par

contre, la température de transition et l'hyperchromicité maximum sont plus grands après action de H_2O_2. Il semble, d'après ces résultats, qu'il y ait une corrélation entre l'hyperchromicité développée à 100° et la fraction de bases non modifiées par l'agent oxydant.

Rappelons enfin qu'au cours de la dégradation du DNA par H_2O_2, nous avons constaté que le rapport $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ dépasse la valeur de 2 qui correspond à une dégradation statistique. HAGEN (1967) a obtenu des résultats similaires par irradiation X de solutions aqueuses de DNA de même concentration (200 mg/litre) ; il les interprète par la formation de grosses molécules dues à des pontages intermoléculaires consécutifs à l'action des radicaux. Nous pensons que nos résultats peuvent s'interpréter de la même façon, bien qu'il semble que par action de H_2O_2, ce phénomène d'agrégation soit beaucoup moins prononcé. Quand la masse moléculaire moyenne en poids n'est plus que de 650.000, nous trouvons, en effet, un rapport $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ = 2,86 (Tableau XVIII) au lieu de 4,72 (HAGEN, 1967).

Dans cette étude de la dégradation du DNA par H_2O_2 en absence d'ions métalliques ajoutés, nous avons vu que la dégradation de 1ère espèce est observée bien que peu importante Nous avons recherché si elle pouvait être due à des coupures préexistantes de la molécule de DNA. Pour déceler ces coupures, nous avons employé la sédimentation de bande en milieu alcalin mise au point par VINOGRAD et utilisée par SINSHEIMER pour résoudre le même problème (voir Chap. I).

Les résultats sont les suivants :

Le DNA V 268 de masse moléculaire 4,1 millions a une constante de sédimentation $S^o_{20,w}$ = 19,1 à pH 5 et 12,9 à pH 13. Cette dernière valeur correspond, d'après la formule empirique de STUDIER (1965) valable en milieu alcalin ($S^o_{20,w}$ = 0,0528 $M^{0,400}$) a une masse moléculaire de 0,93 millions, alors

qu'on s'attendrait à observer une masse moléculaire de 2,05 millions par séparation des deux chaînes de ce DNA, si ces chaînes ne présentaient pas d'interruption. Il y aurait donc en moyenne 2 à 3 coupures préexistantes dans les molécules de DNA de l'échantillon V 268 (LITZLER - communication personnelle - en trouve en moyenne 1,5 à partir des résultats de diffusion de la lumière en milieu alcalin).

Si les ruptures de 1ère espèce (et Tableau XVIII) étaient dues uniquement aux coupures préexistantes, le nombre de ces coupures (calculé à partir de l'expression (9) de la partie théorique) varierait entre 0,75 et 42 suivant l'intensité de l'éclairement, ce qui est évidemment contradictoire. Il semble donc que si ce petit nombre de coupures préexistantes, déterminé par sédimentation alcaline, est responsable en partie des ruptures de 1ère espèce, il ne peut pas en être la seule cause. Nous discuterons à la fin de ce chapitre ce qui nous semble être la véritable raison de cette dégradation de 1ère espèce.

b) Action de H_2O_2 sur le DNA en présence d'ions métalliques de transition

Avant d'examiner les propriétés des systèmes ternaire DNA - H_2O_2 - ion métallique de transition, rappelons brièvement quelques propriétés des systèmes binaires qui le constituent.

- DNA - H_2O_2 : l'eau oxygénée ne provoque de diminution de la masse moléculaire du DNA qu'en présence de lumière, la dégradation se fait alors par l'intermédiaire des radicaux $HO^\bullet$ et suivant un mécanisme de 2ème espèce.

- H_2O_2 - ions métalliques : les ions métalliques de transition (Fe^{++} et Fe^{+++} en particulier) catalysent la décomposition de H_2O_2 en radicaux $HO^{\bullet}{}_2$ et surtout $HO^{\bullet}$ très actif. Ce mode de décomposition est sensiblement modifié par les agents chélatants. Il semble que l'on puisse dire que la vitesse de décomposition et le pouvoir oxydant sont augmentés souvent considérablement si le métal complexé possède encore deux valences libres, et que les réactions en jeu ne sont plus du type radicalaire mais se font par l'intermédiaire de complexes ternaires liant-métal-H_2O_2 dont la structure et les propriétés les apparentent aux catalases et aux peroxydases.

- DNA-ions métalliques. D'après ce qui précède le mode d'interaction entre le DNA et les ions métalliques de transition est particulièrement intéressant à connaître. Nous allons résumer les travaux se rapportant aux interactions des ions métalliques utilisés (Cu^{++}, Fe^{+++}, Fe^{++}) avec le DNA.

Ion cuivrique

EICHHORN et coll. (1965 et 1966) ont montré par l'étude en RMN des nucléosides et des nucléotides que les sites préférentiels de fixation du cuivre sont l'azote 7 de la guanine et de la cytosine et l'azote 1 de la cytosine, il n'y a pas de fixation sur la thymine. Par RPE et titration, ROPARS et VIOVY (1965 et 1966) ont montré que la fixation du cuivre est particulièrement sélective sur l'azote 7 de la guanine. En ce qui concerne le DNA, VENNER et ZIMMER (1966) ont montré que, quand il y a plus d'un ion Cu^{++} par nucléotide, la température de transition des complexes DNA-Cu^{++} décroit linéairement en fonction du contenu en paires G-C du DNA alors que celle du Poly (AT) n'est pas affectée par la présence de cuivre. SCHREIBER (communication personnelle) étudiant par polarographie la fixation des ions Cu^{++} sur des

DNA natifs de différentes sources, a montré que le nombre de sites de fixation croît avec le contenu en paires G-C des DNA.

Tous ces auteurs sont d'accord pour conclure de leurs expériences que, lorsque le cuivre peut se fixer sur les bases du DNA, il se fixe sur la guanine ou les paires G-C et non pas sur les paires A-T. Leurs appréciations sont, par contre, différentes quant aux conditions permettant cette fixation sur les bases du DNA.

D'après VENNER et ZIMMER (1966), à une concentration inférieure à un ion pour deux nucléotides, le cuivre joue le rôle d'ion compensateur étant donné que, dans ces conditions, la température de transition du DNA croît avec son contenu en G-C comme en présence d'ions Na^{+} ou Mg^{++} ; d'autre part, HIAI (1965) et EICHHORN et coll. (1966) ont trouvé que le cuivre, ajouté à la concentration de 2 ions par atome de phosphore, ne provoque une augmentation d'absorption ultra-violette mesurable que lorsqu'il interagit avec du DNA dénaturé. Ils en déduisent que la fixation de l'ion cuivrique ne peut pas se faire sur les bases du DNA natif à la température ordinaire. Il faut cependant remarquer que la spectrophotométrie, méthode employée par HIAI et EICHHORN n'est pas assez sensible pour permettre de détecter la fixation d'un petit nombre d'ions Cu^{++} sur les nucléotides (l'effet hyperchromique observé n'est, en effet, que de 11 % pour une concentration de 2 ions Cu^{++} par nucléotide). RORPARS (1966) et SCHREIBER (communication personnelle) ont, par contre, montré qu'il est possible de fixer jusqu'à 4 ions Cu^{++} pour 100 nucléotides sur du DNA natif de thymus de veau en force ionique 0,1 et qu'à cette force ionique, la fixation sur les phosphates est négligeable.

En conclusion, il est très vraisemblable que, dans les conditions que nous avons utilisées (1 ion Cu^{++} pour 100 nucléotides, force ionique 0,1), tous les ions Cu^{++} sont fixés sur des sites internes du DNA au niveau des paires G-C.

Ions ferriques et ferreux

La fixation de ces ions sur le DNA a été beaucoup moins étudiée que celle de l'ion cuivrique. ROPARS (1966) tire de ses études par titimétrie et RPE les conclusions suivantes :

Aux pH voisins de la neutralité, l'ion ferrique se fixe sur les nucléotides (mais peu ou pas sur les nucléosides) et dans l'ordre G > C > A > T, les liaisons s'effectuant préférentiellement entre l'azote 1 et le groupe aminé. Dans le DNA natif, l'ion ferrique n'est fixé que sur les phosphates et c'est la dénaturation du DNA qui rendrait ses sites internes accessibles à cet ion, il viendrait alors se placer entre la guanine et la cytosine et établirait des liaisons avec les azotes 1 et les groupes aminés de ces deux bases.

EICHHORN (1962) tire de l'étude des courbes de transition du DNA en faible force ionique et en présence d'ion ferreux (2 ions par nucléotide) des conclusions analogues ; cet ion augmente la température de transition comme le font les ions Mg^{++} et Mn^{++}, lesquels se fixent sur les phosphates, mais il cause une rétention totale de l'hyperchromicité après refroidissement (comme le fait l'ion Cu^{++}). Il semble donc que l'on puisse admettre que les ions Fe^{++} et Fe^{+++} se fixent sur les phosphates dans le DNA natif et qu'ils ne peuvent pénétrer dans des sites internes que lorsque le DNA est dénaturé. Remarquons d'ailleurs que ces ions forment des complexes hexavalents octaédriques avec les agents chélatants tandis que l'ion cuivrique forme des

complexes tétravalents plans, ce qui explique que la pénétration de l'ion Cu^{++} entre les plateaux des bases du DNA est stériquement beaucoup plus facile que la pénétration des ions Fe^{++} et Fe^{+++}.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Au cours de cette étude de la dégradation du DNA en présence d'ions métalliques, nous nous sommes heurtés à des difficultés expérimentales liées à la méthode utilisée, à savoir : la diffusion de la lumière. A pH neutre les ions ferreux et ferriques, ajoutés à la solution de DNA, précipitent au bout de quelques heures sous forme de micelles qui diffusent considérablement la lumière. Nous avons réussi à éliminer cet effet parasite, d'une part en acidifiant très légèrement le milieu réactionnel (tampon acétate à pH 6 au lieu de tampon phosphate à pH 7, les acétates ayant en plus l'avantage d'être beaucoup plus solubles que les phosphates), et d'autre part, en limitant la quantité d'ions métalliques ajoutés, à un ion pour 100 nucléotides du DNA.

∝) Action de H_2O_2 sur le DNA en présence d'ions métalliques et à l'obscurité

L'étude a été faite par diffusion de la lumière dans les conditions suivantes : les ions métalliques (Cu^{++}, Fe^{++} ou Fe^{+++} sous forme de sulfates en solution à pH 4), fraîchement préparées sont ajoutés au tampon acétate à pH 6. On ajoute ensuite en agitant une solution concentrée de DNA de thymus de veau (V 26S). Les solutions sont complétées à 50ml par de l'eau distillée, centrifugées, 25 ml de chaque solution sont pipetées dans les cellules de mesure et maintenues

à 35° à l'obscurité. Une première mesure est effectuée dès que l'équilibre thermique est atteint. L'addition dans les cellules, de 0,085 ml de H_2O_2 13 N définit le temps zéro. Dans ces conditions il y a dans les solutions 35 molécules H_2O_2 par nucléotide de DNA et 1 ion métallique pour 106 nucléotides. Au bout de 90 heures, les densités optiques à 260 mμ des solutions ont peu varié (augmentation de 0 à 4 %), de même que les concentrations en H_2O_2 (diminution de 0 à 16 %). Les variations des masses moléculaires du DNA sont représentées sur la Fig. 23.

On constate qu'à l'obscurité, H_2O_2 seule* et les ions métalliques seuls ne provoquent aucune diminution de la masse moléculaire du DNA. Par contre, si les ions métalliques et H_2O_2 sont présents simultanément, la diminution de la masse moléculaire devient mesurable et l'intensité de la dégradation croît dans l'ordre $Fe^{+++} < Fe^{++} < Cu^{++}$.

En présence d'ions Cu^{++} et de H_2O_2, la courbe représentant les variations de $\overline{M_w}(0)/\overline{M_w}(t)$ en fonction du temps présente une concavité toujours tournée vers le bas, comme dans l'action des ultra-sons sur le DNA en absence d'oxygène (LITZLER, communication personnelle). La dégradation est de 1ère espèce. L'expression théorique générale (1) rend compte d'une manière satisfaisante de

$$\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} = 1 + \frac{\overline{M_w}(0)}{2m}\left[x_1 p_1 + B\,\frac{x_2^2}{1 - x_1}\,p_2^2\right] \qquad (1)$$

ce résultat si l'on admet que $x_2 = 0$ et que les liaisons se coupent suivant une cinétique du 1er ordre de constante de

---

* C'est-à-dire sans ions métalliques de transition ajoutés. En utilisant la spectrophotométrie d'absorption atomique, nous n'avons d'ailleurs pas détecté de cuivre dans l'échantillon de DNA utilisé. Etant donné la grande sensibilité de la méthode, ce résultat permet d'affirmer qu'il y en a moins de un ion pour 5.000 nucléotides.

Figure 23

Dégradation de l'échantillon V 26- de DNA de thymus de veau par H_2O_2 en fonction du temps et en présence d'ions métalliques et à l'obscurité.

DNA : $6{,}38.10^{-4}$ M
ion métallique : $6{,}0 .10^{-6}$ M
H_2O_2 : $2{,}2 .10^{-2}$ M
Tampon acétate à pH6: 0,1 M
température : 35°C

- ⊗ DNA + Cu^{++} + H_2O_2
- □ DNA + Fe^{++} + H_2O_2
- ⊠ DNA + Fe^{+++} + H_2O_2
- ⊙ { DNA seul
  { DNA + H_2O_2
  { DNA + Cu^{++} ou Fe^{++} ou Fe^{+++}

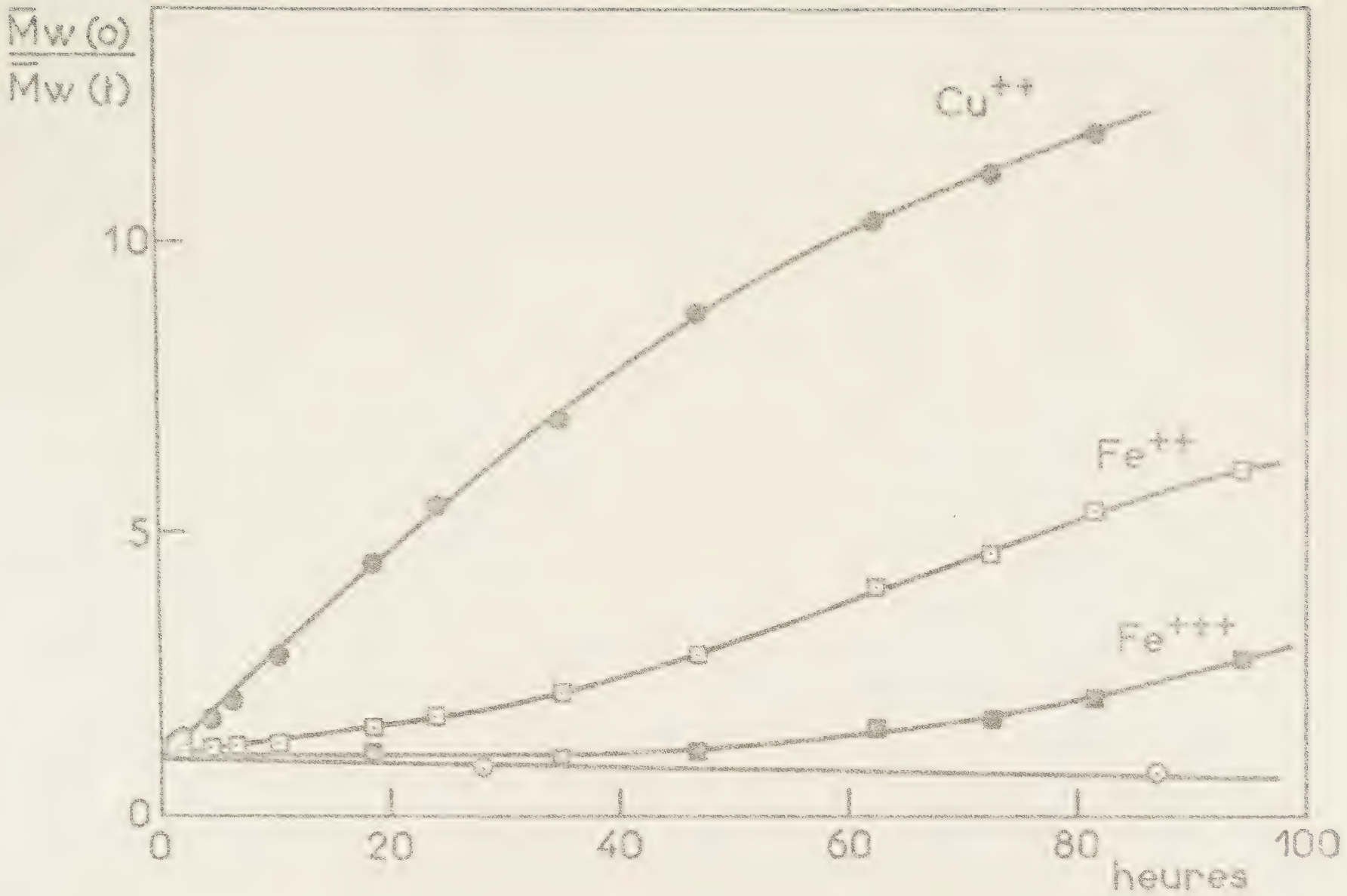

$\frac{\overline{Mw}(o)}{\overline{Mw}(t)}$
Cu++
Fe++
Fe+++
10
5
0
0
20
40
60
80
100
heures

Figure 24

Dégradation de l'échantillon V 268 de DNA de thymus de veau par H_2O_2 en fonction du temps à l'obscurité.

⊛ : En présence de Cu^{++} (1 ion pour 106 nucléotides du DNA)

○ : En absence d'ions métalliques

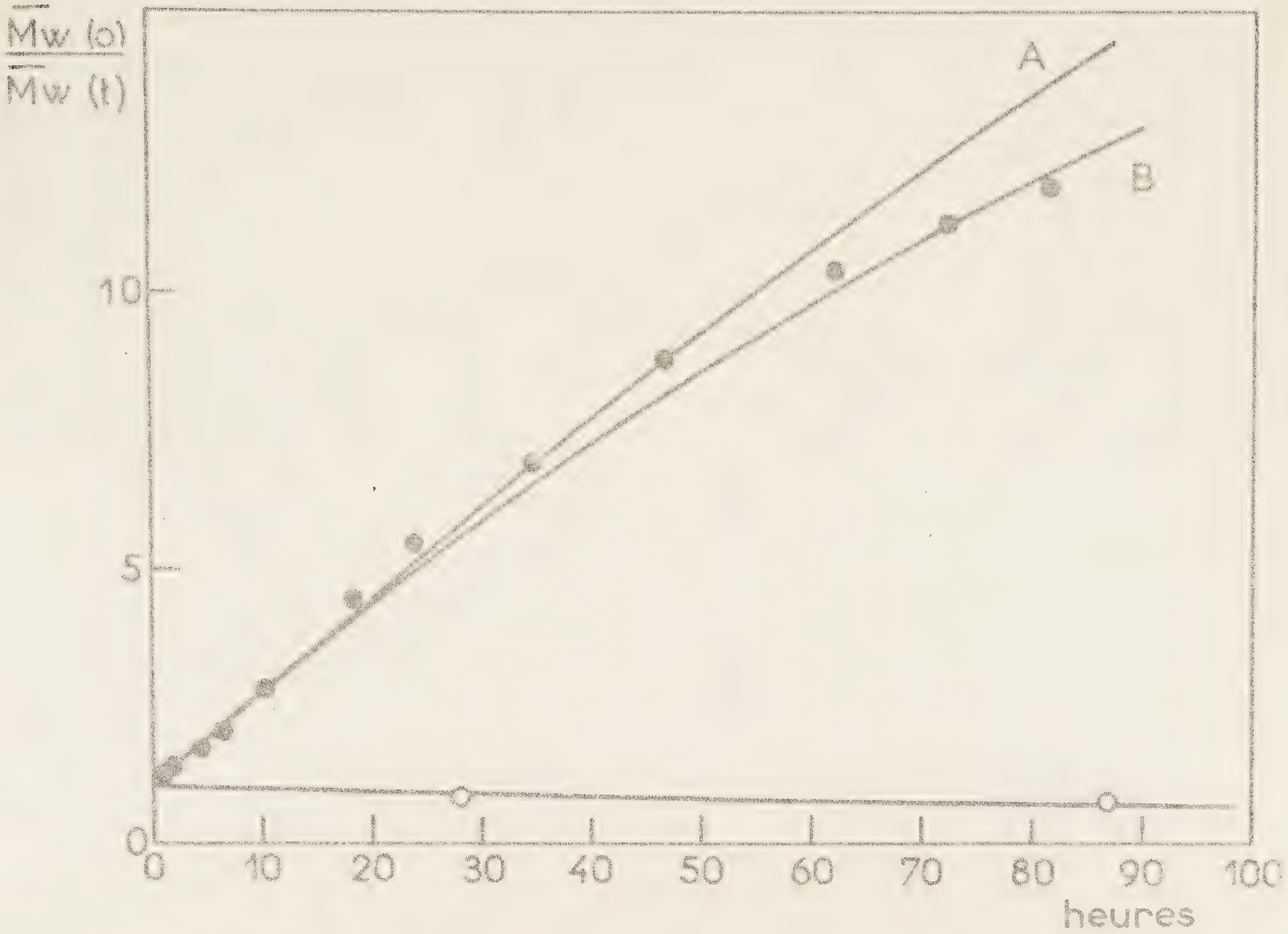
(A) et (B) sont les courbes représentatives de l'équation (1) de la partie théorique pour :

$$\begin{cases} x_1 k_1 = 72.10^{-6} \\ p_1 = 1 - e^{-k_1 t} \\ x_2 = 0 \end{cases}$$

Avec :

$$\begin{cases} (A) : x_1 = 2,0.10^{-2} \\ (B) : x_1 = 1,0.10^{-2} \end{cases}$$

Les conditions expérimentales sont celles indiquées Fig. 23.


$\frac{\overline{Mw}\,(o)}{\overline{Mw}\,(t)}$
A
B
10
5
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
heures

vitesse k_1 telle que $p_1 = 1 - e^{-k_1 t}$ (ceci est justifié comme nous l'avons vu plus haut, par le fait que l'eau oxygénée était en grand excès et se décomposant très lentement, sa concentration peut être considérée comme à peu près constante pendant toute la durée de la dégradation). (1) devient donc dans ce cas :

$$\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} = 1 + \frac{\overline{M_w}(0)}{2m} x_1 (1 - e^{-k_1 t}) \qquad (2)$$

La tangente à l'origine, bien définie par les points expérimentaux, correspond au développement limité de (2) :

$$\frac{\overline{M_w}(0)}{\overline{M_w}(t)} = 1 + \frac{\overline{M_w}(0)}{2m} x_1 k_1 t \qquad (3)$$

(3) tracé en pointillé sur la figure 24 permet donc de déterminer le produit $x_1 k_1$, on trouve $x_1 k_1 = 72.10^{-6}$ heure^{-1}. Il ne reste donc qu'à choisir la valeur de x_1 permettant de faire coincider la courbe théorique avec les points expérimentaux. Sur la figure 24 on a tracé, en traits pleins les courbes A et B correspondant à $x_1 = 1{,}0.10^{-2}$ et $2{,}0.10^{-2}$, elles encadrent les points expérimentaux.

En présence des ions Fe^{++} et Fe^{+++} l'allure des courbes est plus complexe. La représentation des valeurs de $(1/t)(\overline{M_w}(0)/\overline{M_w}(t) - 1)$ en fonction du temps donne des courbes présentant un minimum comme dans le cas vu précédemment (Fig. 22). Dans le cas de l'ion ferreux, l'allure de la courbe peut s'interpréter comme étant due à la superposition d'une dégradation de 1ère espèce portant sur un très petit nombre de sites ($x_1 = 6.10^{-4}$ soit environ 3 par molécule), et d'une dégradation de 2ème espèce. Dans le cas de l'ion ferrique, seule se manifeste pratiquement la dégradation de 2ème espèce.

Figure 25

Dégradation de l'échantillon V 268 de DNA de thymus de veau par H_2O_2 en fonction du temps et en présence d'ions métalliques et à la lumière.

DNA : $6{,}38.10^{-4}$ M
Ion métallique: $6{,}0 .10^{-6}$ M
H_2O_2 : $2{,}2 .10^{-2}$ M
Tampon acétate à pH 6 : 0,1 M

Les solutions sont éclairées avec la lampe Philips "TL, lumière noire" de 40 W émettant entre 3.000 et 4.200 Å et placée à 10 cm. La température est de 30°.

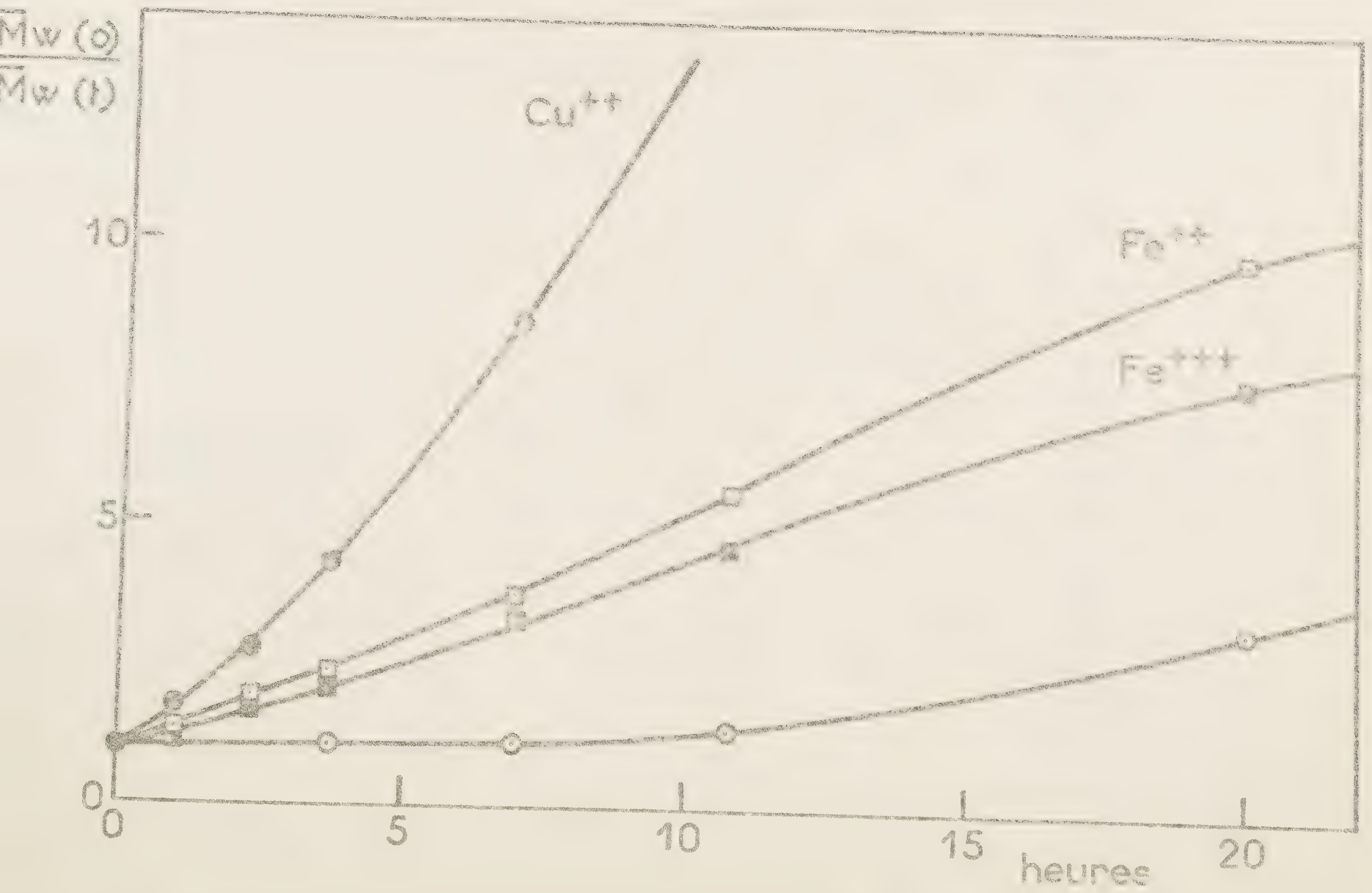
● DNA + H_2O_2 + Cu^{++}
□ DNA + H_2O_2 + Fe^{++}
▨ DNA + H_2O_2 + Fe^{+++}
○ DNA + H_2O_2

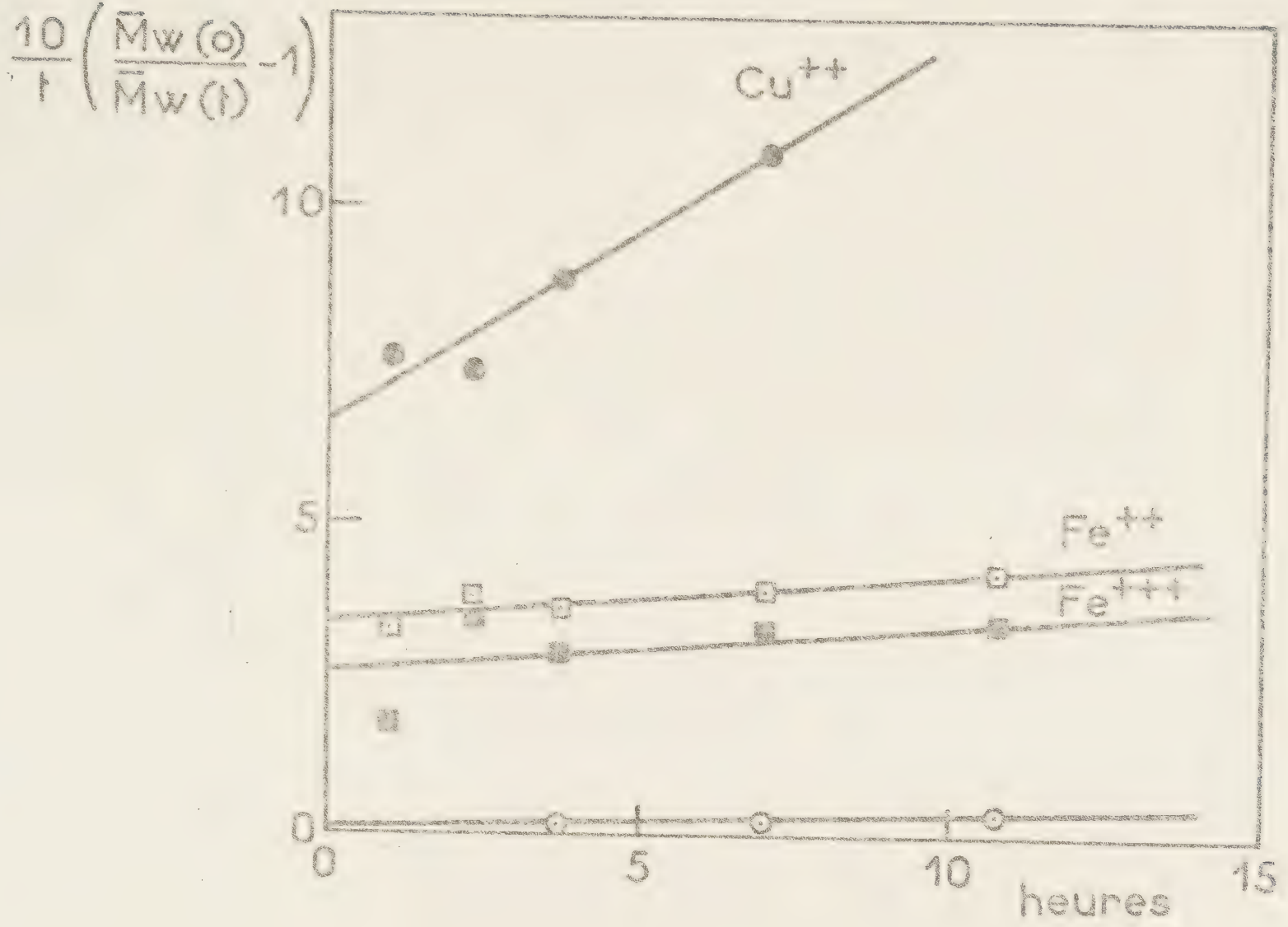
Figure 26

Les mêmes résultats sont représentés en

$$\frac{10}{t}\left(\frac{M_w(0)}{M_w(t)} - 1\right)$$

en fonction du temps.


$\frac{\overline{M}w\,(o)}{\overline{M}w\,(t)}$
10
5
0
0
5
10
15
20
heures
Cu++
Fe++
Fe+++


$\frac{10}{t}\left(\frac{\bar{M}w(o)}{\bar{M}w(t)}-1\right)$
Cu++
Fe++
Fe+++
10
5
0
0
5
10
15
heures

b) Action de H_2O_2 sur le DNA en présence d'ions métalliques et de lumière

Les solutions témoins de l'expérience précédente, ne contenant pas d'eau oxygénée, ont été refrodies à 30°. Au temps zéro, on a ajouté 0,075 ml de H_2O_2 13 N dans chaque cellule et on a éclairé avec le tube Philips "Tl, lumière noire" de 40 watts, placé à 10 cm. Dans ces conditions la dégradation du DNA a été rapide, la Fig. 25 montre qu'elle s'est faite, comme précédemment, avec une intensité croissante dans l'ordre $Fe^{+++} < Fe^{++} < Cu^{++}$, mais elle est beaucoup plus rapide qu'à l'obscurité et il y a apparition d'une dégradation de 2ème espèce qui se superpose à celle de 1ère espèce, même en présence de cuivre. Toutes les courbes sont, en effet, concaves vers le haut, au moins au début de la dégradation ; de plus, on peut les assimiler à des paraboles comme le montre la représentation en $(1/t)(\overline{M}_w(0)/\overline{M}_w(t) - 1)$ laquelle donne des droites (Fig. 26). Ceci correspond donc à l'expression théorique (1) où $p_1 = k_1 t$ et $p_2 = k_2 t$. On peut, par conséquent, calculer les fractions $x_1 k_1$ et $x_2 k_2$ des liaisons qui se coupent par heure, respectivement suivant un mécanisme de 1er et de 2ème espèce (Tableau XVII B). On voit que $x_1 k_1$ et $x_2 k_2$ sont plus grands à la lumière, quel que soit l'ion métallique considéré.

c) Action des ions métalliques de transition sur la configuration du DNA

Après avoir vu qu'en absence d'eau oxygénée et à l'obscurité, les ions Cu^{++}, Fe^{++} et Fe^{+++} ne modifient pas la masse moléculaire du DNA, nous avons recherché si dans les mêmes conditions et à la même concentration (1 ion pour 106 nucléotides du DNA), ils ont une influence sur sa

configuration (rayon de giration et masse par unité de longueur).

Les valeurs de (I/C) sin $\theta/2$, calculées à partir des valeurs de l'intensité I de la lumière diffusée à différents angles θ par les solutions de DNA de concentration $C = 6,4.10^{-4}$ M ont été tracées en fonction de sin $\theta/2$ sur la Fig. 27. On voit qu'elles tendent par valeurs supérieures vers une limite quand θ tend vers π. Ceci montre, comme nous l'avons vu au chapitre I, qu'à la force ionique utilisée (0,1), la molécule de DNA ne peut pas être assimilée à un bâtonnet rigide, mais plutôt à une chaîne filiforme ("Zig Zag Chain") ou vermiculaire ("Wormlike chain") - (LUZZATI et BENOIT, 1961, SADRON 1959 et 1961).

Les valeurs asymptotiques obtenues correspondent à des masses par unité de longueur nettement supérieures à la valeur qui correspond au modèle de CRICK et WATSON (200 Å). L'écart est sensiblement plus grand en présence des ions Fe^{+++} qu'en présence des ions Fe^{++} ou Cu^{++} ou qu'en absence d'ions métalliques ajoutés (Fig. 27 et Tableau XX). Inversement, le rayon de giration de la molécule de DNA est plus petit en présence des ions Fe^{+++} que dans les autres cas, alors que les masses moléculaires sont à peu près les mêmes dans tous les cas (Tableau XX).

Tableau XX

	$\overline{M_w}$. 10^{-6}	M/L (Å)	$\sqrt{\overline{s^2}}$ (Å)
DNA	3,0	294	1.910
DNA + Cu^{++}	3,3	301	2.000
DNA + Fe^{++}	3,2	303	1.960
DNA + Fe^{+++}	3,1	415	1.680

Figure 27

Influence des ions métalliques de transition sur la valeur de la masse apparente par unité de longueur des molécules de DNA de thymus de veau (V 268)

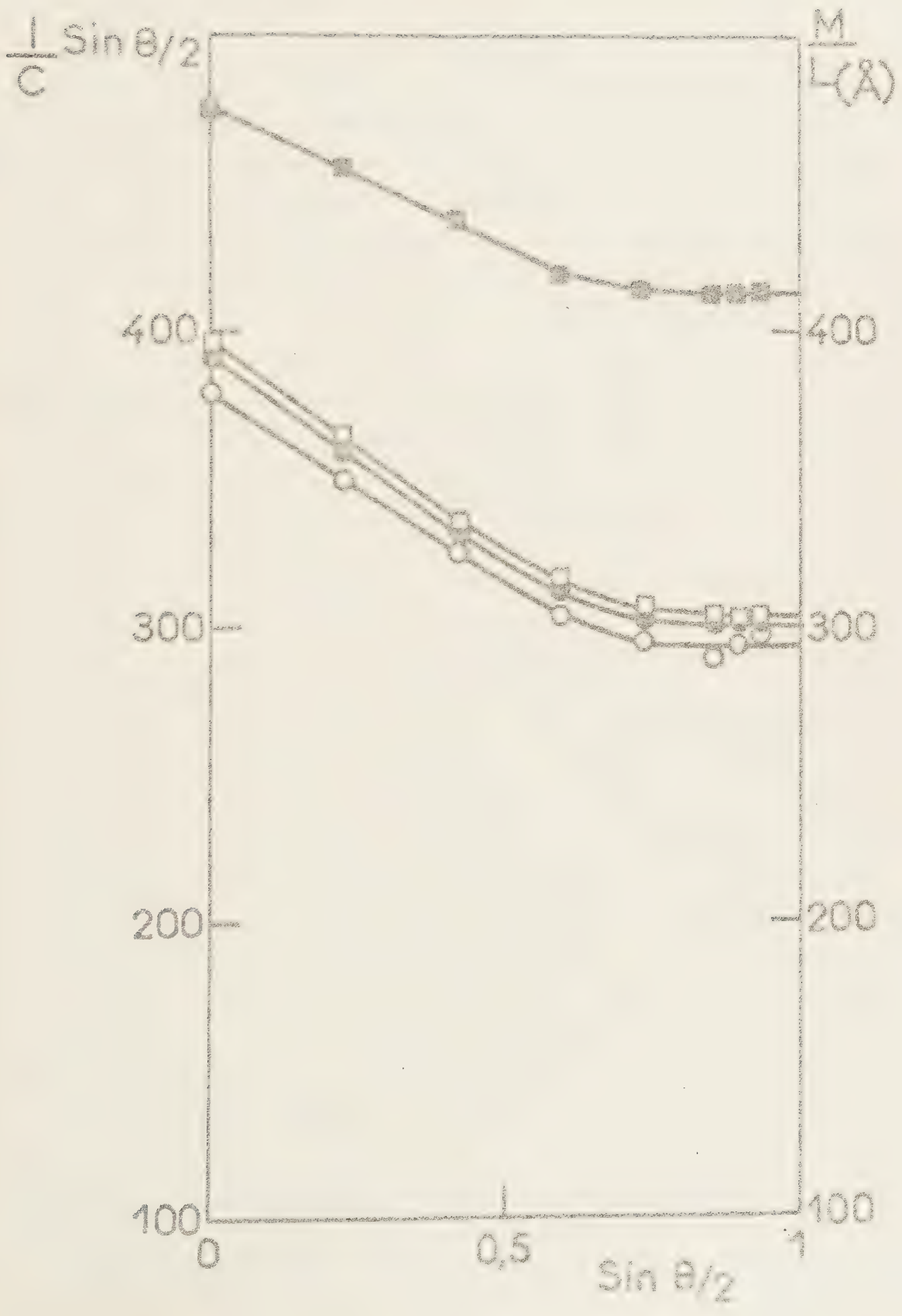
○ DNA : $6{,}38.10^{-4}$ M

▨ DNA : $6{,}38.10^{-4}$ M + Cu^{++} : $6{,}0.10^{-6}$ M

□ DNA : $6{,}38.10^{-4}$ M + Fe^{++} : $6{,}0.10^{-6}$ M

▩ DNA : $6{,}38.10^{-4}$ M + Fe^{+++} : $6{,}0.10^{-6}$ M

Les solutions sont tamponnées par de l'acétate de sodium 0,1 M à pH 6. La température est de 35°C.


l/c Sin θ/2
M/L (Å)
400
300
200
100
400
300
200
100
0
0,5
1
Sin θ/2

DISCUSSION

Nous allons d'abord examiner les résultats concernant la diminution de la masse moléculaire du DNA produite par l'eau oxygénée en présence d'ions métalliques ajoutés, à l'obscurité puis à la lumière. Ceci nous permettra ensuite de compléter la discussion des résultats obtenus sans additions d'ions métalliques.

α) A l'obscurité en présence d'ions métalliques ajoutés

On pouvait prévoir, connaissant l'effet catalytique des ions Fe^{+++} et surtout Fe^{++} sur la décomposition de H_2O_2 que la dégradation du DNA serait plus rapide en présence des ions Fe^{++} que des ions Fe^{+++}. L'efficacité plus grande de la dégradation en présence des ions Cu^{++} qu'en présence des ions Fe^{++} eux-mêmes n'était par contre pas prévisible à partir des propriétés catalytiques des ions libres : elle doit être mise en relation comme nous l'avons vu plus haut avec une chélation partielle de l'ion Cu^{++}. Les travaux que nous avons passés en revue nous montrent d'ailleurs que, dans les conditions utilisées, tous les ions cuivre mis en solution sont effectivement fixés dans des sites internes du DNA et ceci à raison de 1 ion pour 106 nucléotides. Si l'on admet qu'une rupture de molécule (c'est-à-dire deux coupures en vis-à-vis de liaisons de 1ère espèce) ne peut se produire qu'au site de fixation d'un ion cuivre, on doit trouver $x_1 = 2/106 = 1{,}89$ %. Ce résultat est confirmé par l'expérience d'une façon satisfaisante, puisqu'on trouve que les courbes correspondant à $x_1 = 1$ % et $x_1 = 2$ % encadrent les points expérimentaux.

A partir de ces résultats, il nous semble possible de proposer le schéma réactionnel suivant :

L'ion Cu^{++} est fixé dans un site interne du DNA, d'où les deux chaînes lui sont également accessibles. Ce site doit être une paire G-C, une liaison se faisant avec l'azote 7 de la guanine (la fixation sur l'azote 7 de la guanine a peut-être déjà un effet labilisant comme LAWLEY (1961) l'a montré avec les agents alkylants). En présence d'eau oxygénée, ce complexe local a des propriétés peroxydasiques*. Cela signifie que, par analogie au composé E_I (peroxydase + H_2O_2), il peut provoquer deux deshydrogénations successives, lesquelles ont lieu vraisemblablement sur les déoxyriboses (DH) des deux chaînes opposées du DNA, en 3' ou en 5', chaque radical D° formé pouvant entraîner la coupure de la liaison phosphoester voisine. La séquence pourrait donc s'écrire, par analogie avec les réactions peroxydasiques (BRILL 1966)**:

$$E + H_2O_2 \longrightarrow E_I$$

$$E_I + DH \longrightarrow E_{II} + D^\circ \longrightarrow \text{coupure 1ère chaîne}$$

$$E_{II} + DH \longrightarrow E + D^\circ \longrightarrow \text{coupure 2ème chaîne}$$

E représente ici le complexe local Site-Cu^{++} et E_I et E_{II} les composés oxydés de ce complexe, contenant respectivement 2 et 1 équivalents oxydants. On voit que, d'après ce schéma une seule molécule H_2O_2 pourrait rompre la molécule de DNA en deux réactions qui sont successives et par conséquent pas indépendantes dans le temps contrairement à celles qui sont produites par les radicaux libres HO°.

Les résultats obtenus en présence des ions Fe^{++} et Fe^{+++} sont plus difficiles à interpréter, cependant la dégradation de 2ème espèce, observée dans ces deux cas, peut être mise en relation avec le fait que, contrairement au

---

* SIGEL H. et ERLENMEYER H. (1966) - Helv. Chim. Acta, 49, 1266
SIGEL H. PRIJS B. et ERLENMEYER H. (1967) - Experientia 23, 170.

** BRILL A.S. (1966) - "Comprehensive Biochemistry" Vol. 14, p. 447, Elsevier Publ, Londres, New-York.

cuivre, ces ions se fixent à l'extérieur du DNA (ROPARS, 1966) où leur mode d'action peut être, soit du type peroxydasique, n'intéressant qu'une seule chaîne du DNA, soit du type radicalaire par l'intermédiaire des espèces $HO^{\bullet}$ et $HO^{\bullet}_2$.

L'augmentation de la masse par unité de longueur et la diminution du rayon de giration, provoqués par l'addition de petites quantités d'ions Fe^{+++} (1 pour 100 nucléotides), semble bien indiquer que cet ion, fixé sur des sites externes, favorise le repliement de la molécule de DNA en créant des liaisons intramoléculaires.

Dans le cas de l'ion Fe^{++}, la dégradation de 1ère espèce observée au début est explicable par la présence de 3 sites internes seulement en moyenne par molécule de DNA. Nous pensons que ce sont les coupures préexistantes (dont le nombre a été évalué à 2 ou 3 par molécule) qui favorisent la pénétration des ions Fe^{++} dans ces sites internes. Cette interprétation est étayée par le fait qu'il n'a été possible de détecter, par polarographie, un masquage de l'ion Fe^{++} par le DNA qu'avec un échantillon de DNA contenant un nombre important de coupures préexistantes (SCHREIBER, communication personnelle).

β) A la lumière, en présence d'ions métalliques ajoutés

Dans le cas de l'ion Cu^{++}, l'apparition d'une dégradation de 2ème espèce en plus de celle de 1ère espèce doit évidemment être attribuée à l'action des radicaux $HO^{\bullet}$ produits par la photolyse de H_2O_2. Le tableau XVII B et C montre d'autre part que la dégradation de 1ère espèce est 2,6 fois plus rapide qu'à l'obscurité ; ceci semble montrer que le complexe ternaire (site interne-Cu^{++}-H_2O_2) peut être activé par la lumière. Son maximum d'absorption dans l'U.V. (3.600 Å d'après SIGEL et ERLENMEYER, 1966) est d'ailleurs

précisément situé dans la bande d'émission de la source de lumière utilisée (3.000 à 4.200 Å).

Dans le cas des ions Fe^{++} et Fe^{+++}, il est remarquable que la dégradation de 1ère espèce devienne importante à la lumière. Il ne peut pas s'agir uniquement, comme dans le cas de l'ion Cu^{++}, d'une activation des quelques sites de 1ère espèce déjà présents à l'obscurité, car, dans ce cas, on s'attendrait à l'apparition d'un palier de masse très net dès le début de l'irradiation. La seule explication vraisemblable est que les ions fer, fixés d'abord à l'extérieur de la molécule, et capables de migrer le long de la chaîne de DNA comme l'a montré ROPARS (1965), sont piégés dans les interruptions créées par les radicaux HO° ; ils forment alors avec H_2O_2 des complexes capables de rompre rapidement la chaîne en vis-à-vis.

Il est difficile d'expliquer, par contre, le fait que la dégradation de 2ème espèce en présence de lumière soit nettement plus lente avec les ions Fe^{++} et Fe^{+++} qu'avec l'ion Cu^{++} (Tableau XVII B et C) alors qu'elle devrait être équivalente dans les trois cas si elle est due aux radicaux HO° produits par photolyse de H_2O_2. Nous pensons que les résultats obtenus en présence des ions fer sont faussés au bout de quelques heures à cause de la précipitation de micelles d'hydroxyde de fer. Sur la Fig. 25, on peut d'ailleurs voir apparaître des paliers de masse moléculaire au bout de 20 heures. Ces paliers sont sans doute des artéfacts ainsi que l'indique une expérience faite, dans les mêmes conditions, avec l'ion Fe^{++}, mais poursuivie plus longtemps: La masse moléculaire apparente est à peu près constante entre 20 et 30 heures, elle décroît ensuite de nouveau, tandis que le rayon de giration apparent passe par une valeur minimum au palier de masse pour croître ensuite jusqu'à des valeurs aberrantes. Ce phénomène nous semble être explicable par la

formation, en petit nombre, de quelques grosses micelles d'hydroxyde de fer qui interviennent, à cause de leur taille, beaucoup plus sur la moyenne en z du rayon de giration que sur la moyenne en poids de la masse moléculaire. Enfin, il faut signaler qu'une difficulté supplémentaire, en présence des ions fer, vient du fait que le passage de la forme réduite (Fe^{++}) à la forme oxydée (Fe^{+++}) et inversement, est possible en présence d'eau oxygénée. En particulier, l'oxydation de Fe^{++} en Fe^{+++} doit diminuer l'activité catalytique de l'ion Fe^{++} au cours du temps et, par conséquent, la production de radicaux $HO^{\bullet}$.

γ) En absence d'ions métalliques ajoutés

Nous avons vu qu'en absence d'ions métalliques ajoutés, la dégradation est essentiellement de 2ème espèce ; il y a, cependant, toujours une petite dégradation de 1ère espèce. Cette dégradation de 1ère espèce s'est traduite par un petit palier de masse dans l'expérience faite à la lumière du jour (cf. Fig. 21) ; il ne s'agit pas là d'un cas isolé, nous avons, en effet, obtenu ce petit palier (ou, au minimum un point d'inflexion) dans de nombreuses expériences faites sur les échantillons V 268 et V 236, à la lumière du jour et sans ions métalliques ajoutés. Nous avons aussi obtenu des points d'inflexion au début de la dégradation à l'obscurité en présence des ions Fe^{++} et Fe^{+++}. Ces paliers ou ces points d'inflexion n'ont jamais été observés dans des conditions de dégradation plus énergiques, c'est-à-dire chaque fois que les solutions étaient éclairées par de la lumière ultra-violette, et ceci en absence comme en présence d'ions métalliques ajoutés. Ces résultats peuvent s'interpréter de la façon suivante : des traces d'ions métalliques, présentes dans l'échantillon de DNA utilisé, ou introduites

par les solutions salines (le sulfate de sodium utilisé dans ces expériences peut avoir introduit jusqu'à 1 ion Fe^{+++} pour 1.000 nucléotides du DNA) peuvent être responsables, comme nous venons de le voir, d'une dégradation de 1ère espèce de constante de vitesse k_1. Si l'on opère à l'obscurité ou à la lumière du jour, les radicaux HO° produits sont peu nombreux et $k_2 < k_1$ (dans l'exemple ci-dessus (Fig. 21) : $k_1/k_2 \sim 3.000$ si l'on admet que $x_1 + x_2 = 1$). Ceci entraîne donc la formation d'un palier, ou au minimum d'un point d'inflexion. Si, par contre, on opère à la lumière, k_2 augmente considérablement jusqu'à devenir du même ordre de grandeur que k_1, dans ce cas, le point d'inflexion disparaît (Figs. 17 et 18).

L'augmentation observée de la dégradation de 1ère espèce avec l'intensité de l'éclairement (Tableau XVII A) ne peut pas, comme nous l'avons vu plus haut, être interprétée seulement par des coupures préexistantes. Ce résultat peut, par contre, s'expliquer par la présence dans la solution de traces d'ions métalliques. L'interprétation est alors la même que celle que nous proposons plus haut pour expliquer l'augmentation de la dégradation de 1ère espèce par H_2O_2 en présence des ions fer quand on passe de l'obscurité à la lumière.

CHAPITRE IV

ACTION D'AUTRES PEROXYDES SUR LE DNA

INTRODUCTION

Nous avons vu que l'action de l'acide persuccinique sur le DNA et ses dérivés est très différente de celle de H_2O_2. Nous avons voulu préciser dans quelle mesure les effets observés avec l'acide persuccinique sont spécifiques de ce peracide, ou s'il s'agit d'effets caractéristiques des peracides ; nous avons choisi pour cette comparaison l'acide peracétique. Par ailleurs nous avons également examiné l'effet sur le DNA et sur la cytosine de 2 hydroperoxydes dont l'action pouvait éventuellement être de même type que celle de H_2O_2.

I - Action de l'acide peracétique ($CH_3\,C(=O)OOH$)

L'action de ce peracide sur l'adénine et ses dérivés a été étudiée par STEVENS et coll. (1958 et 1959) - qui ont observé, comme nous l'avons fait dans le cas de l'acide persuccinique, la formation de 1-N-oxydes. Il semble que d'une façon générale, les peracides soient susceptibles de transformer l'adénine et la cytosine (ou leurs nucléosides et nucléotides) en dérivés 1-N-oxydés puisque CRAMER et coll. (1963), (1964) ont obtenu des dérivés 1-N-oxydés de la cytosine et de l'adénine par action d'un peracide assez différent : l'acide perphtalique.

1) Décomposition de l'acide peracétique

La courbe représentant la diminution au cours du temps du pouvoir oxydant total d'une solution d'acide peracétique $4,3.10^{-3}$ M à pH 7 et à 37° est pratiquement superposable à celle que nous avons obtenue avec l'acide persuccinique dans des conditions analogues (Fig. 28). Dans les deux cas la formation d'eau oxygénée est peu importante en absence de DNA.

2) Action de l'acide peracétique sur le DNA

Nous nous sommes contentés de comparer l'action de l'acide peracétique sur le DNA (modification de sa composition chimique et diminution de sa masse moléculaire) avec celle de l'acide persuccinique ; pour cela nous avons fait cette étude dans des conditions similaires : l'échantillon (V 202) de DNA de thymus de veau à la concentration de 1 mg par ml est traité à 37° et à l'obscurité par l'acide peracétique à des concentrations molaires variant de $2,1.10^{-2}$ à $16,8.10^{-2}$ M et correspondant à 5, 10, 20 et 40 mg de peroxyde de disuccinoyle par ml. Le pH du milieu est maintenu à 7 par des additions de soude au cours de la réaction.

Au bout de 24 heures, le pouvoir oxydant du mélange est négligeable (1,1 % d'eau oxygénée plus 0,3 % de peracide). Une partie aliquote des solutions est diluée et agitée pendant 30 minutes avec le mélange chloroforme plus alcool isoamylique pour être étudiée par diffusion de la lumière. Le reste des solutions est dialysé contre de l'eau distillée, lyophilisé et analysé par la méthode décrite au chapitre I.

Les résultats de l'analyse chimique du DNA, rassemblés dans le Tableau XXI, montrent une analogie très grande avec ceux des tableaux VII et IX obtenus avec l'acide persuccinique. La dégradation des bases du DNA se fait préférentiellement dans le même ordre : G > A et C > T. On observe

Figure 28

Décomposition de l'acide peracétique

▨ : Diminution du pouvoir oxydant total d'une solution d'acide peracétique $6,3.10^{-3}$ M tamponnée à pH 7 par du succinate de sodium 0,1 M et maintenue à 37° et à l'obscurité.

La courbe en pointillé montre la diminution du pouvoir oxydant total d'une solution d'acide persuccinique placée dans des conditions semblables.

○ : Eau oxygénée formée lors de la décomposition de l'acide peracétique.

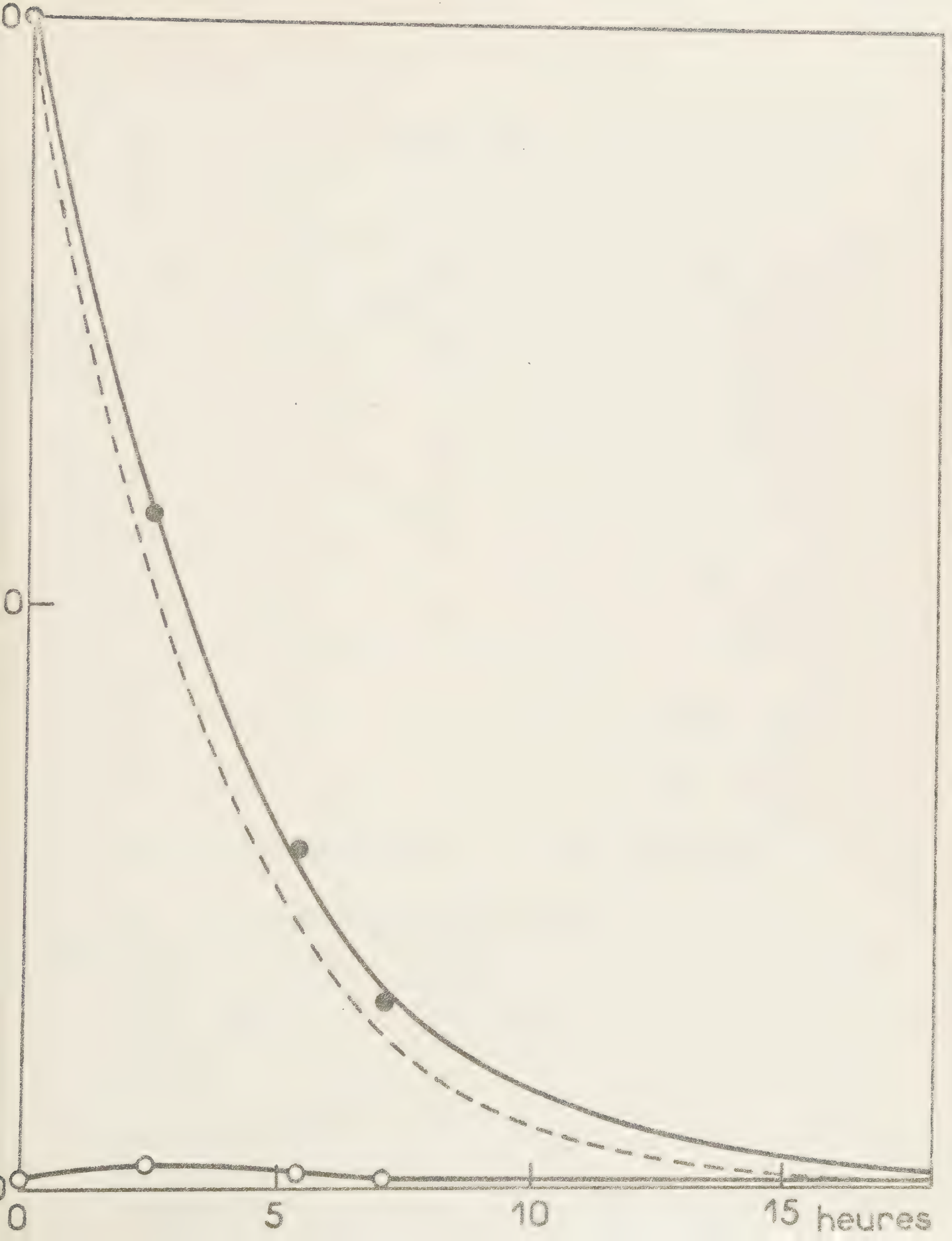

0
0
0
5
10
15 heures

Tableau XXI

Action de l'acide peracétique sur le DNA

Peracide	0	$4,2.10^{-2}$M	$8,4.10^{-2}$M	$16,8.10^{-2}$M
Guanine	100	32	28	8,5
Adénine	100	43	34,5	19
Hypoxanthine	0	9	15	21
A_2	0	-	3	2,5
A_3	0	5,5	7	4,5
Cytosine	100	41	28,5	14
Uracile	0	6,5	12,5	8,5
Thymine	100	64	65,5	56
Bases normales	100	45,5	40,0	25,5
Bases nouvelles	0	5,5	9,5	9,5

Récupération des bases par rapport au phosphore

DNA (V 202) : C = 1 mg/ml

Acide peracétique : concentrations variables correspondant respectivement à 10, 20 et 40 mg de péroxyde de disuccinoyle par ml

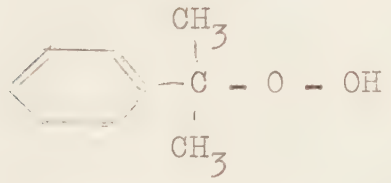
Tampon acétate de sodium 2,3 M à pH 7

Temps d'action : 24 h à 37° à l'obscurité.

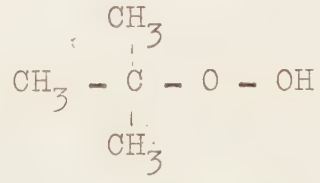
également l'apparition d'hypoxanthine et d'uracile. La dégradation des bases est cependant plus intense avec l'acide peracétique puisqu'elle est de 60 % au lieu de 32 % dans des conditions comparables de pH et de concentration en peracide et en DNA (Tableau VIII, colonne 3 et Tableau XXI, colonne 3).

La diminution de la masse moléculaire du DNA est plus rapide qu'avec l'acide persuccinique. Après action de l'acide peracétique aux concentrations de $2,1.10^{-2}$ M et $4,2.10^{-2}$ M, la masse moléculaire du DNA baisse respectivement à 1,14 et 0,75 million, alors qu'après action de l'acide persuccinique à la concentration de $4,2.10^{-2}$ M, elle ne baisse qu'à 3,1 millions. On constate cependant que la diminution de masse moléculaire observée avec les deux peracides est à peu près la même pour un même taux de dégradation des bases.

II - Action des hydroperoxydes de cumène et de butyle tertiaire



Hydroperoxyde de cumène



Hydroperoxyde de butyle tertiaire

1) Décomposition des hydroperoxydes

L'étude a été faite en tampon succinate 0,1 M à pH 7. Les hydroperoxydes, peu solubles dans l'eau, ont d'abord été mis en solution dans l'éthanol puis ajoutés aux solutions aqueuses. La concentration finale en hydroperoxyde est $2,5.10^{-3}$ M. Des ions cobalt (SO_4Co : $2,5.10^{-4}$M) ont été ajoutés comme catalyseurs (KHARASH et coll., 1952). Dans ces conditions, on n'observe pas à l'obscurité de diminution appréciable de la concentration en oxydant dans les solutions des deux hydroperoxydes, même au bout de 27 jours à 37°. Ce résultat indique

une grande stabilité et laisse prévoir une faible réactivité de ces peroxydes en solution aqueuse.

2) Action de l'hydroperoxyde de butyle tertiaire sur la cytosine

La cytosine étant la base la plus sensible à l'action de H_2O_2 et de l'acide persuccinique, nous avons étudié sa dégradation éventuelle par l'un des deux hydroperoxydes utilisés.

L'étude est faite en tampon succinate 0,1 M à pH 7. L'hydroperoxyde de butyle tertiaire est à la concentration de 8.10^{-3} M, la cytosine à $1,4.10^{-4}$ M et les ions cobalt à 6.10^{-4} M. Au bout de 17 jours à 37°, le spectre U.V. de la cytosine est homothétique au spectre de départ, on constate seulement une diminution de 4 % de la densité optique. Dans des conditions semblables, la diminution est de 85 % en 4 jours seulement avec H_2O_2 et de 75 % en 1 jour avec l'acide persuccinique.

3) Action sur le DNA

Après un contact des deux hydroperoxydes avec le DNA pendant 5 jours à 37° et à l'obscurité, dans des conditions analogues à celles utilisées avec H_2O_2 (Tableau XIV A), on n'observe aucune modification significative de la composition chimique du DNA ni aucune diminution de la masse moléculaire.

DISCUSSION

Nous avons vu que la vitesse de décomposition de l'acide peracétique et son mode d'action sur le DNA sont très voisins de ceux de l'acide persuccinique et par contre très différents de ceux de l'eau oxygénée. Le fait que l'acide peracétique agisse plus rapidement que l'acide persuccinique est sans doute dû à son encombrement moindre qui lui permet un meilleur accès aux sites réactifs de la molécule de DNA. Le fait que nous n'ayons pas mis en évidence la formation de 1-N-oxydes sur les bases du DNA peut cependant être attribué, comme dans le cas de l'acide persuccinique à l'inaccessibilité des azotes 1 de l'adénine et de la cytosine, engagés dans des liaisons hydrogène.

Acide persuccinique : $HOOC - CH_2 - CH_2 - C(=O) - OOH$

Acide peracétique : $CH_3 - C(=O) - OOH$

L'analogie entre les modes d'action des acides persuccinique et peracétique doit être attribuée à la fonction peracide qui réagit essentiellement avec les hétérocycles des bases et affecte relativement peu les liaisons phosphoester ; ainsi dans le cas de l'acide peracétique, la masse moléculaire est encore de 750.000 quand 65 % des bases du DNA ont déjà été dégradées.

Les hydroperoxydes de butyle tertiaire et de cumène ont, à l'obscurité, une action insignifiante sur le DNA et ses dérivés ; ceci peut être attribué d'une part à leur très grande stabilité à la température ordinaire, mais sans doute aussi à leur faible solubilité dans l'eau et à leur caractère hydrophobique qui leur gêne l'approche de la molécule de DNA. En fait, LATARJET et coll. (1958) n'ont observé aucune action inactivante de ces peroxydes sur le DNA transformant de pneumocoque.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous nous sommes proposés dans ce travail d'étudier l'action de quelques peroxydes sur le DNA et sur ses constituants. Cette étude a été menée suivant deux directions :

- Variation des effets observés quand on passe des bases aux nucléotides, puis au DNA,

- Influence de la nature du peroxyde sur le type et l'intensité de la dégradation et comparaison avec les effets produits par d'autres agents dégradants.

La première série d'études a montré qu'il y a des différences qualitatives et quantitatives dans la dégradation des hétérocycles des bases du DNA suivant que ces hétérocycles font partie des bases libres, des nucléotides libres ou sont intégrées dans la structure ordonnée du DNA. Ces différences sont attribuables :

- aux changements stériques correspondants et à l'existence d'une structure secondaire dans le DNA,

- aux modifications locales des charges (pKa),

- à la propriété qu'ont les purines de capter les radicaux libres.

La conséquence la plus importante à tirer de ces résultats est qu'il est certainement très aléatoire d'extrapoler au DNA les effets constatés sur ses constituants.

La deuxième série d'études a montré que les acides persuccinique et peracétique ont le même mode d'action. Ils agissent par leur fonction peracide qui a la propriété de donner un atome d'oxygène naissant au substrat oxydable. Cela se traduit de la façon suivante :

- il y a formation de 1-N-oxydes de l'adénine et de la cytosine quand l'azote 1 n'est pas engagé dans une liaison hydrogène comme cela est le cas dans le DNA,

- la destruction des bases est importante, mais dans le DNA elle a lieu in situ, sans entraîner d'une façon concomittante le départ des résidus oxydés ou la dislocation de la structure de la molécule,

- il n'y a pas d'action décelable sur les liaisons déoxyribose-phosphate et déoxyribose-base des nucléotides, ceci explique que l'on observe une dépolymérisation relativement faible du DNA.

L'eau oxygénée, par contre, agit très différemment des peracides et son mode d'action est grandement influencé par la lumière et les ions de métaux de transition. Son action sur les bases est assez faible tandis que son action dégradante sur le DNA est importante en présence de lumière ou d'ions métalliques de transition. Cela nous a amenés à développer un calcul statistique applicable à n'importe quel cas où il y aurait dégradation d'une molécule en double chaîne par la superposition des mécanismes de 1ère espèce et de 2ème espèce (rupture de la molécule en 1 coup ou en 2 coups) ayant des constantes de vitesse différentes, et en particulier aux cas de la dégradation du DNA par les ultra-sons et par la DNAse acide. En ce qui concerne l'action de l'eau oxygénée sur le DNA, ce calcul statistique nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

1°) <u>A l'obscurité</u>. La dégradation du DNA, étudiée en suivant les variations de sa masse moléculaire, ne se manifeste qu'en présence d'ions métalliques comme catalyseurs.

En présence d'ions cuivriques, la dégradation, dite de 1ère espèce, se fait par coupure quasi simultanée des deux chaînes du DNA en vis-à-vis, comme dans l'action des ultra-

sons ou de la DNAse acide. Nous pensons que ce type de dégradation est dû à la formation d'un complexe ternaire entre un site interne du DNA au niveau des paires G-C, l'ion cuivrique et la molécule H_2O_2, ce complexe étant doué d'activité peroxydasique.

En présence des ions ferreux et ferriques, les coupures de 1ère espèce et de 2ème espèce coexistent. Nous avons attribué ce résultat au fait que ces ions ne peuvent pénétrer dans des sites internes du DNA et y provoquer des coupures de 1ère espèce qu'aux endroits où existent des interruptions cachées de la chaîne.

2°) A la lumière. En absence, comme en présence d'ions métalliques, il y a production de radicaux libres ($HO^{\bullet}$ essentiellement) par photolyse de H_2O_2. Ces radicaux ont un mode d'action très semblable à ceux qui sont produits par l'action des radiations ionisantes sur les milieux aqueux aérés. La destruction des bases du DNA est moins rapide qu'avec les peracides, mais il y a, en outre, oxydation du déoxyribose ce qui entraîne d'une part la libération de bases et, d'autre part, une dépolymérisation importante de DNA suivant un mécanisme de 2ème espèce.

En présence d'ions cuivriques, la dégradation de 1ère espèce que nous avons déjà observée à l'obscurité, ajoute ses effets à celle de 2ème espèce, mais elle est sensiblement plus rapide qu'à l'obscurité. Cette accélération est probablement due à l'activation par la lumière (λ = 3.600 Å) des complexes ternaires : site (G-C) - Cu^{++} - H_2O_2.

En présence des ions ferreux et ferriques, la dégradation de 1ère espèce, qui était peu importante à l'obscurité, devient très importante à la lumière. Elle doit probablement être attribuée à la formation de complexes

internes par piégeage des ions fer dans les interruptions de chaînes créées par les radicaux libres issus de la décomposition de H_2O_2.

La manifestation, en absence d'ions métalliques ajoutés, de coupures de 1ère espèce doit, sans doute, être attribuée à la fixation des traces d'ions métalliques, toujours présentes dans les réactifs utilisés, (fer, en particulier), au niveau des interruptions de la double chaîne du DNA ; que ces interruptions préexistent ou soient créées par les radicaux libres issus de la décomposition de H_2O_2.

Les hydroperoxydes de cumène et de butyle tertiaire agissent très peu sur le DNA à l'obscurité. Cette faible réactivité semble due à leur stabilité à la température ordinaire et à leur caractère hydrophobique.

Si l'on examine les incidences de nos résultats sur les aspects biologiques de l'action des peroxydes sur le DNA, il apparaît tout d'abord que l'intensité de la dégradation des bases du DNA, obtenue par les quelques peroxydes utilisés, est parallèle à l'intensité de leur action sur le DNA transformant de pneumocoque (LATARJET et coll. 1958) ou de H. Influenzae (D. LUZZATI et coll., 1961 et M.R. CHEVALLIER non publié). Elle se fait dans l'ordre suivant : acide persuccinique > eau oxygénée > hydroperoxyde de cumène. Il semble donc que l'on puisse attribuer, au moins en grande partie, l'inactivation du DNA transformant par les peroxydes, à l'action de ces peroxydes sur les bases du DNA.

En ce qui concerne les mutations, FREESE (1963) distingue celles qui ont lieu par "transition" c'est-à-dire par remplacement d'une purine par une autre purine de celles qui ont lieu par "transversion" c'est-à-dire par remplacement d'une purine par une pyrimidine ou inversement. Le premier type de mutation a été obtenu avec l'acide

nitreux qui, en déaminant les bases, provoque après deux replications le remplacement d'une paire A-T par une paire G-C et inversement (LAVALLE, 1960). En 1962, PONNAMPERUMA a émis l'hypothèse que les rayons γ peuvent agir d'une façon analogue à celle de l'acide nitreux étant donné qu'ils ont une action déaminante notable sur les bases.

JENSEN et coll. (1951) ont trouvé que l'effet mutagène de l'eau oxygénée sur Neurospora est augmentée par éclairement ; or, nous avons trouvé que la lumière, ainsi que certains ions métalliques, augmentent son action sur le DNA ; nous avons en particulier mis en évidence la formation d'hypoxanthine et de 4,6 diamino-5-formamidopyrimidine, provenant vraisemblablement de l'adénine du DNA. Dans ces conditions, on devrait trouver que les mutations induites par l'eau oxygénée s'apparentent à celles qui sont observées avec les radiations ionisantes.

En ce qui concerne l'acide persuccinique, M.R. CHEVALLIER (1964) explique son action mutagène sur E. Coli par la production de lésions prémutagènes dues à la formation des 1-N-oxydes de l'adénine et de la cytosine, lésions susceptibles de réverser par retour à la base d'origine ou d'évoluer vers une lésion mutagène. Il semble, d'après nos résultats, que ces lésions mutagènes pourraient être dues à la transformation de l'adénine-1-N-oxyde et de la cytosine 1-N-oxyde respectivement en hypoxanthine et en uracile.

Les mutations provoquées par l'acide persuccinique et l'eau oxygénée seraient donc du type "transition". Dans le cas de l'eau oxygénée, il pourrait cependant y avoir aussi des mutations par "transversion" dans la mesure où nous avons vu que les bases (adénine et cytosine, en particulier) tendent à se détacher du DNA et pourraient, par conséquent, être remplacées par une base quelconque au cours de la replication.

Il serait intéressant d'examiner si l'effet mutagène de l'eau oxygénée, qui a été mis en évidence dans quelques cas isolés, pourrait être augmenté et rendu plus spécifique par la présence d'ions métalliques de transition, agissant comme des catalyseurs liés au DNA. En particulier, l'effet mutagène du cuivre mis en évidence par DEMEREC et coll. (1951) pourrait-être dû à la présence de traces d'eau oxygénée dans les cellules. Par ailleurs, s'il s'avérait que l'ion cuivirique se fixe de façon spécifique au niveau de certaines séquences du DNA, le fait d'avoir, avec l'eau oxygénée, des ruptures de 1ère espèce au niveau de ces sites de fixation, devrait permettre d'obtenir des segments de DNA ayant des caractéristiques définies, dont l'utilisation pour la détermination des séquences ou la séparation des marqueurs génétiques est évidente. Cette propriété, trouvée sur le DNA, doit aussi pouvoir être utilisée pour mettre en évidence des séquences analogues existant dans les acides ribonucléiques.

BIBLIOGRAPHIE

ALTENBURG L.S. - (1954), Proc. Nat. Acad. Sci., (U.S.), 40, 1037.

APPLEQUIST J. - (1961), Arch. Biochem. Biophys., 95, 42.

BACH M.L., LUZZATI D. et CHEVALLIER M.R. - (1966), B.B.A., 119, 75.

BACQ Z.M. et ALEXANDER P., - (1955), : "Fundamentals of Radiobiology", Butterworths Scientific Publications London.

BAXENDALE J.H. - (1952), "Advance in Catalysis", 4, 62.

BARB W.G., BAXENDALE J.H., GEORGE P. et HARGRAVE K.R. - (1951), Trans. Farad. Soc., 47, 462.

BENOIT H. - (1963), ICES "Electromagnetic Scattering", M. Kerker Ed., Perg. Press.

BERNARDI G. et SADRON Ch. - (1964), Biochemistry, 3, 1411.

BERNEIS K., KOFLER M., BOLLAG W., ZELLER P., KAISER A. et LANGEMANN A., - (1963), Helv. Chim. Acta, 46, 2158.

BERNEIS K., KOFLER M. et BOLLAG W. - (1964), Experientia, 20, 73.

BLUM J. - (1959), Thèse Strasbourg, p. 66, 95 et 99.

BRIGGS A. - (1922), J. Biol. Chem., 53, 13.

BRINTZINGER H. et ERLENMEYER H. - (1965), Helv. Chim. Acta, 48, 826.

BUTLER J.A.V. et CONWAY B.E. - (1963), Proc. Roy. Soc., (B), 141, 562.

CANELLAKIS E.S. et MANTSAVINOS R. - (1958), B.B.A., 27, 643.

CAVALIERI L.F. et ROSENBERG B.H. - (1961), Biophys. J., 1, 323.

CHALK A.J. et SMITH J.F. - (1954), Nature, 174, 802.

CHARLESBY A. - (1954), Proc. Roy. Soc., A 224, 120.

CHEVALLIER M.R., SCHWEITZ H. et LUZZATI D. - (1959), C.R. Acad. Sci., 248, 2413.

CHEVALLIER M.R. et LUZZATI D. - (1960), C.R. Acad. Sci., 250, 1572.

CHEVALLIER M.R. - (1964), Thèse Strasbourg.

CLOVER et HOUGHTON - (1904), J.A.C.S., 31, 55.

CRAMER F., RANDERATH K. et SCHAFER E.A. - (1963a), B.B.A., 72, 150.

CRAMER F. et SEIDEL H. - (1963b), B.B.A., 72, 157.

CRAMER F. et SEIDEL H. - (1963c), Z. Naturforschung, 18b, 164.

CRAMER F. et SEIDEL H. - (1963d), Z. Naturforschung, 18b, 510.

CRAMER F. et SEIDEL H. - (1964), B.B.A., 91, 14.

CRAMER F., FITTLER F., KUNTZEL H. et SCHÄFER E.A. - (1963e), Z. Naturforschung, 18b, 668.

CRICK F.H.C. et WATSON J.D. - (1953), Symposium of Cold Spring Harbour.

CROUZET - (1966), Thèse Strasbourg.

DICKEY F.H., CLELAND G.H. et LOTZ C. - (1949), Proc. Nat. Acad. Sci., (U.S.), 35, 581.

DOTY P., MARMUR J., EIGNER J. et SCHILDKRAUT C. - (1960), Proc. Nat. Acad. Sci., (U.S.), 46, 461.

DOUGHERTY G. et HOMMOND P.D. - (1935), J.A.C.S., 57, 117.

DUNN D., MAGUIRE M.H. et BROWN G.B. - (1959), J. Biol. Chim., 234, 620.

EICHHORN G.L. - (1962), Nature, 194, 474.

EICHHORN G.L. et CLARK P. - (1965), Proc. Nat. Acad. Sci., (U.S.), 53, 586.

EICHHORN G.L., CLARK P. et BECKER E.D. - (1966), Biochemistry, 5, 245.

EIGNER J. et DOTY P. - (1965), J. Mol. Biol., 12, 549.

EKERT B. et MONIER R. - (1959), Nature, 184, 58.

EKERT B. et MONIER R. - (1960), Nature, 188, 309.

"ENZYMES" (The) - (1963), Vol. 8, P.D. BOYER, H. LARDY et K. MYRBACK, Ed., p. 147, Acad. Press, New-York and London.

ERLENMEYER H., MÜLLER U. et SIGEL R. - (1966), Helv. Chim. Acta, 49, 681.

FREESE E. - (1963), dans Molecular Genetics, J.H. Taylor Ed., Academic Press, New-York, London, Part I, p. 207.

GEIDUSCHEK E.P. - (1961), Proc. Nat. Acad. Sci., (US), 47, 950.

GREEN J.H., RALPH B.J. et SCHOFIELD P.J. - (1963), Nature, 198, 754.

GREER S. et ZAMENHOF S. - (1962), J. Mol. Biol., 4, 123.

GROH - (1957), Cours de Chimie Analytique, ENSCS, 2ème Année.

HAGEN U. - (1967), B.B.A., 134, 45.

HEMS G. - (1958), Nature, 181, 1721.

HEMS G., et EIDINOFF M.L. - (1958), Rad. Res., 9, 305.

HEMS G. - (1960), Rad. Res., 13, 777.

HIAI S. - (1965), J. Mol. Biol., 11, 672.

HOHN Th. et POLLMANN W. - (1963), Z. Naturforschung, 18b, 919.

HOLTZER A. - (1953), J. Polym. Sci., 17, 432.

HORNER L. et JÜRGENS E. - (1958), Angew. Chem., 70, 266.

HURLBERT R.B., SCHMITZ H., BRUMM A.F. et Van POTTER R. - (1954), J. Biol. Chem., 209, 23.

JENSEN K.A., KIRK I., KOLMARK G. et WESTERGAARD M. - (1951), Cold Spring Harbour Symposia Quant. Biol., 16, 245.

JULIA M. - (1959), "Mécanismes Electroniques en Chimie Organique" Gauthier-Villars Ed.

KAY E.R.M., SIMMONS N.S. et DOUNCE A.L. - (1952), J.A.C.S., 74, 1724.

KHARASCH M.S., FONO A., NUDENBERG W. et BISCHOF B. - (1952), J. Org. Chem., 17, 207.

LATARJET R. - (1956), Ciba Symp. on ionizing Radiations and Cells Metabolisms, p. 275.

LATARJET R., REBEYROTTE N. et DEMERSEMAN P. - (1958), dans "Les Peroxydes Organiques en Radiobiologie" M. Haissinsky Ed., p. 61, (Masson et Cie), Paris.

LATARJET R., EKERT B., APELGOT S. et REBEYROTTE N. - (1961), J. Chim. Phys., 58, 1046.

LAVALLÉ R. - (1960), C.R. Acad. Sci., 250, 1134.

LAWLEY P.D. - (1961), J. Chimie Physique, 58, 1011.

LEHMANN I.R., BESSMAN M.J., SIMMS E.S. et KORNBERG A. - (1958), J. Biol. Chem., 233, 163.

LUZZATI D. et CHEVALLIER M.R. - (1957), Ann. Inst. Pasteur, 93, 366.

LUZZATI D., SCHWEITZ H., BACH M.L. et CHEVALLIER M.R. - (1961), J. Chimie Physique, 58, 1021.

LUZZATI V. et BENOIT H. - (1961), Acta Crystal., p. 297.

MARKHAM R. et SMITH J.D. - (1949), Biochem. J. 45, 294.

MARTIN et DOTY P. - (1949), Analyt. Chem., 21, 965.

MATSUSHITA S., IBUKI F. et AOKI A. - (1963), Arch. Biochem. Biophys., 102, 446.

MELZER M.S. et TOMLINSON R. - (1966), Arch. Biochem. Biophys., 115, 226.

MICHELSON A.M. - (1963), "The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides", Acad. Press.

"NUCLEIC ACIDS" (The) [illegible] - (1955), E. Charghaff and J.N. Davidson, Ed., Acad. Press, New-York.

PASCAL P. - (1960), "Nouveau Traité de Chimie Minérale", Tome XIII, Masson Ed.

PONNAMPERUMA C.A. - (1962), Thèse, Berkeley, California.

POUYET J. et WEILL G. - (1957), J. Polym. Sci., 23, 739.

PRIESS H. et ZILLIG W. - (1965), Z. für Physiol. Chemie, 342, 73.

PULLMANN A. et PULLMANN B. - (1961), J. Chimie Physique, 58, 904.

ROPARS C. - (1966), Thèse Paris.

ROPARS C. et VIOVY R. - (1965), J. Chimie Physique, 62, 408.

SADRON Ch. - (1954), J. Polym. Sci., 12, 69.

SADRON Ch. - (1959), 11ème Conseil de Chimie (Solvay), Ed. Stoops, Bruxelles.

SADRON Ch. - (1961), J. Chimie Physique, 58, 877.

SCHACHMAN H.K. - (1959), "Ultracentrifugation in Biochemistry", Acad. Press, New-York, and London.

SCHOLES G. et WEISS J. - (1952), Exp. Cell. Res. Supp. 2, 219.

SCHOLES G. et WEISS J. - (1960), Nature, 185, 305.

SCHOLES G. - (1963), Progr. in Biophys. and Mol. Biol., 13, 59.

SCHUMAKER V.N., RICHARDS E.G. et SCHACHMAN H.K. - (1956), J.A.C.S., 78, 4230.

SCHUMB W.C., SATTERFIELD C.N., WENTWORTH R.L. - (1955), "Hydrogen Peroxide" Reinhold Publ. Corp., New-York.

SCHWEITZ H. et LUZZATI D. - (1963), J. Chimie Physique, 60, 1173.

SCHWEITZ H. - (1967), C.R. Acad. Sci., 264, Série D, 1335.

SEIDEL H. - (1966), B.B.A., 129, 412.

SEVAG M.G., LACKMANN D.B. et SMOLENS J. - (1938), J. Biol. Chem., 124, 424.

SIGEL H. et MÜLLER U. - (1966), Helv. Chim. Acta, 49, 671.

SIGEL H. et ERLENMEYER H. - (1966), Helv. Chim. Acta, 49, 1266.

SIGNER R. et SCHWANDER H. - (1949), Helv. Chim. Acta, 32, 853.

SIGNER R. et SCHWANDER H. - (1950), Helv. Chim. Acta, 33, 1521.

SINSHEIMER R.L. et KOERNER J.F. - (1952), J. Biol. Chim., 198, 293.

SINGER B. et FRAENKEL-CONRAT H. - (1965), Biochemistry, 4, 226.

SOBELS F.H. - (1954), Drosophila Inform. Serv., 28, 156.

STEINER et BEERS - (1961), "Polynucleotides".

STEVENS M.A. et BROWN G.B. - (1958a), J.A.C.S., 80, 2759.

STEVENS M.A. et MAGRATH D.I., SMITH H.W. et BROWN G.B. - (1958b), J.A.C.S., 80, 2755.

STEVENS M.A., SMITH H.W. et BROWN C.B. - (1959), J.A.C.S., 81, 1734.

STUDIER F.W. - (1965), J. Mol. Biol., 11, 373.

SUEOKA N. - (1959), Proc. Nat. Acad. Sci., (US), 45, 1480.

SWERN D. - (1947), J.A.C.S., 69, 1692.

SWERN D. - "Organic Reactions", Tome VII, p. 395.

SWERN D. et coll. - (1955), J.A.C.S., 77, 5537.

SYMONS M.C.R. - (1960), "Peroxide Reaction Mechanisms", Interscience Publ.

THOMAS C.A. - (1956), J.A.C.S., 78, 1861.

THOMAS C.A. et DOTY P. - (1956), J.A.C.S., 78, 1854.

TOBOLSKY A.V. et MESROBIAN R.B. - (1954), "Organic Peroxides", Interscience Publ.

UNENFRIEND S., CLARK C.T., AXELROD J. et BRODI B.B. - (1954), J. Biol. Chem., 208, 731.

URI N. - (1952), Chem. Reviews, 50, 375.

Van ARKEL G.A. - (1958), Thèse Utrecht.

VENNER H. et ZIMMER Ch. - (1966), Biopolymers, 4, 321.

VINOGRAD J., BRUNER R., KENT R. et WEIGLE J. - (1963), Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 49, 902.

WAGNER R.P., HADDOX C.H., FUERST R. et STONE W.S. - (1950), Genetics, 35, 237-248.

WEIL R. et VINOGRAD J. - (1963), Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.), 50, 730.

WIPPLER C. et SCHEIBLING G. - (1954), J. Chim. Phys., 51, 201.

WYATT G.R. - (1951), Biochem., 48, 584.

YAMAFUJI K. et UCHIDA Y. - (1966), Nature, 209, 301.

YOUNG E.T. et SINSHEIMER R.L. - (1965), J. Biol. Chem., 240, 1274.

ZELL R. et SIGEL H. - (1966), Helv. Chim. Acta, 49, 870.

Addendum

DEMEREC G., BERTANI et FLINT J. - (1951), Am. Naturalist., 85, 119,

DUVAL J. - (1967) - Thèse Strasbourg.

JACOBSON H.W. et SMITH G.W. - (1954), J. Am. Chem. Soc., 76, 4494.

KHARMANDARYAN M.O. et ALEKSEEVA E.A. - (1931), Chem. Abstr., 3230.

KIRSON B. - (1954), Bull. Soc. Chim. France, p. 950.

LONDOS D. - (1965), Thèse Strasbourg.

SHRITALSKII E.I. et KONOVALOVA B.A. - (1931), Chem. Abstr., p. 3230.

Propositions données par la Faculté
ou, éventuellement, seconde Thèse :

"Catalases et peroxydases"

Strasbourg, le 25 Mai 1967

Le Président du Jury,

signé : Ch. SADRON

VU
Strasbourg, le 5 Juin 1967

LE DOYEN

signé : J.H. VIVIEN

VU et permis d'imprimer
Strasbourg, le 6 Juin 1967

Le Recteur de l'Académie de Strasbourg
Président du Conseil de l'Université,

signé : M. BAYEN